

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN FUNCIONAL DE
LAS INTEGRINAS BETA 1 HUMANAS MEDIANTE
ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Alfonso Luque Jiménez

Bajo la dirección del doctor

Carlos Cabañas Gutiérrez

Madrid, 2011

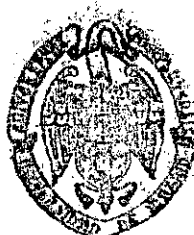
ISBN: 978-84-694-4159-6

© Alfonso Luque Jiménez, 1997

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**



**ESTUDIO DE LA REGULACIÓN FUNCIONAL
DE LAS INTEGRINAS $\beta 1$ HUMANAS MEDIANTE
ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECÍFICOS**



ARCHIVO

**TESIS DOCTORAL
ALFONSO LUQUE JIMÉNEZ**

1997

DIRECTOR: Dr. CARLOS CABAÑAS GUTIÉRREZ

El **Dr. Carlos Cabañas Gutiérrez**, Profesor Titular de Escuela Universitaria del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, certifica:

que **Alfonso Luque Jiménez**, con DNI nº 52.111.166 y licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Alcalá de Henares, ha realizado bajo mi dirección el trabajo: "Estudio de la regulación funcional de las integrinas $\beta 1$ humanas mediante anticuerpos monoclonales específicos". Y para que así conste, y a los efectos de presentación del mismo para optar al Título de Doctor firmo la presente certificación.

Madrid, de Noviembre de 1997

Fdo.: **Dr. Carlos Cabañas Gutiérrez**
Profesor Titular de Escuela Universitaria
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

A mis padres
A Ceci y Arancha
A Nati

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Cabañas Gutiérrez, como director de mi Tesis Doctoral, por la confianza depositada sobre mí en todo momento, por enseñarme a desenvolverme en el trabajo de laboratorio y por supuesto por haberme mostrado tal y como es este "mundo de fieras" que es la investigación.

Al Dr. Francisco Sánchez-Madrid por todas las facilidades y apoyos recibidos durante el transcurso de la realización de este trabajo, así como a todo el personal del Departamento de Inmunología del Hospital de la Princesa que de alguna manera han conseguido que la realización de este trabajo fuese más llevadera.

Al Dr. Enrique Blazquez, como director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por permitirme desarrollar la Tesis Doctoral en el Departamento, así como al resto de los profesores que contribuido a facilitarme la elaboración de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio por su amistad, sus tertulias, por sus ratos agradables y, como no, por tantas "orgías" disfrutadas en el laboratorio.

También agradecer a mis padres y hermano por el apoyo constante recibido durante todo el proceso de elaboración de esta publicación.

Por último y no menos importante, agradecer a Nati por algo más que la ayuda y comprensión en el último periodo de la presentación de este trabajo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Familias de moléculas de adhesión.....	1
1.1.1. Cadherinas.....	1
1.1.2. Selectinas.....	2
1.1.3. Inmunoglobulinas.....	4
1.1.4. Integrinas.....	6
1.2. Integrinas $\beta 1$ (CD29) o VLA.....	11
1.3. Estructura de las integrinas.....	14
1.4. Regulación funcional de las integrinas.....	18
1.4.2. Activación de las integrinas por estímulos extracelulares.....	20
1.4.3. Modulación de la afinidad de las integrinas a través de señales intracelulares (<i>inside-out</i>).....	23
1.5. Señalización celular mediada por integrinas (<i>outside-in</i>).....	27
1.5.1. Coordinación de la señalización intracelular.....	32
1.5.2. Inducción de la expresión génica mediado por integrinas.....	33
1.6. Papel de las integrinas en procesos biológicos.....	34
1.7. Enfermedades causadas por deficiencias funcionales de las integrinas y posibles terapias utilizadas.....	37

2. OBJETIVOS..... 39

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Células y cultivos celulares.....	40
3.2. Anticuerpos monoclonales.....	41
3.3. Proteínas de la matriz extracelular.....	41
3.3.1. Fibronectina.....	41
3.3.2. Laminina.....	43
3.3.3. Colágeno.....	44
3.4. Acoplamiento del AcM TS2/16 a sefarosa CL4B.....	45
3.5. Purificación de integrinas $\beta 1$ activadas por cromatografía de inmunoafinidad.....	45
3.6. Inmunización de los ratones y generación de hibridomas.....	47
3.7. E.L.I.S.A.....	48
3.8. Técnicas de Western-Blot.....	48
3.9. Técnicas de citometría de flujo.....	49
3.10. Inmunoprecipitación.....	50
3.11. Ensayos de adhesión celular.....	50
3.12. Marcaje radiactivo de fibronectina.....	53
3.13. Ensayo de unión de fibronectina soluble a diferentes tipos celulares.....	53
3.14. Biotinilización de los AcMs.....	54
3.15. Ensayo de competición de epítomos entre distintos AcMs.....	54
3.16. Mapeo de los epítomos reconocidos por distintos AcMs en la subunidad $\beta 1$	55
3.17. Técnicas de microscopía de fluorescencia.....	56

4. RESULTADOS

4.1. Purificación de integrinas $\beta 1$	57
---	----

4.2. Obtención del AcM inhibidor de la adhesión celular mediada por VLA-1: 5E8D9.....	58
4.2.1. Hibridomas productores de AcMs que reconocen integrinas $\beta 1$	58
4.2.2. Selección de los AcMs positivos en ELISA que inhiben la adhesión a ligandos de VLA-1.....	59
4.2.3. El AcM 5E8D9 reconoce VLA-1.....	60
4.2.4. Expresión de receptores de colágeno y laminina por las líneas celulares NB100 y DX3.....	62
4.2.5. Regulación funcional de VLA-1.....	63
4.2.5.1. Mg^{2+} y Mn^{2+} inducen activación de VLA-1.....	64
4.2.5.2. Efecto inhibitorio del ión Ca^{2+}	64
4.2.5.3. El AcM TS2/16 activa VLA-1 y VLA-2.....	66
4.3. AcMs que reconocen epítomos de activación en la subunidad $\beta 1$ de las integrinas VLA: HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21.....	68
4.3.1. Selección de AcMs con distinta reactividad en diferentes condiciones de activación de integrinas VLA.....	68
4.3.2. Los AcMs HUTS reconocen la subunidad $\beta 1$ (CD29).....	71
4.3.2.1. Análisis por Western-Blot.....	71
4.3.2.2. Técnicas de inmunoprecipitación.....	72
4.3.2.2.1. En ausencia de cationes divalentes..	72
4.3.2.2.2. Efecto del Mn^{2+} en los precipitados de los AcMs HUTS.....	73
4.3.2.2.3. Inmunoprecipitación en condiciones disociantes de los heterodímeros VLA...	75
4.3.3. La activación de las integrinas $\beta 1$ en linfoblastos T inducen la expresión de los epítomos HUTS.....	76
4.3.4. Correlación funcional entre los niveles de expresión de los epítomos HUTS y el grado de activación de las integrinas $\beta 1$	78
4.3.5. Los AcMs HUTS reconocen epítomos solapantes entre los residuos 355-425 de la subunidad $\beta 1$	79
4.3.6. Los epítomos HUTS se comportan como LIBS.....	82
4.3.7. Los AcMs HUTS inducen activación funcional de las integrinas $\beta 1$	83
4.3.8. La activación de las integrinas $\beta 1$ en todos los sistemas celulares viene representado por un incremento en la expresión de los epítomos HUTS.....	84
4.3.9. El grado de activación basal de las integrinas VLA depende del tipo celular y viene representado por la expresión de los epítomos HUTS.....	86
4.3.10. Modulación de la afinidad de las integrinas $\beta 1$ por los ésteres de forbol.....	89
4.3.10.1. Expresión de los epítomos HUTS.....	89
4.3.10.2. Ensayos de unión de ligando soluble.....	90
4.3.11. Mecanismo de acción de los AcMs HUTS.....	92
4.3.11.1. Ensayos de unión de ligando soluble.....	92
4.3.11.2. Ensayos de adhesión celular preincubando con los respectivos AcMs.....	93
4.3.11.3. Los AcMs HUTS inducen <i>spreading</i> celular.....	96
4.3.12. Correlación funcional entre los distintos estados de afinidad de las integrinas VLA.....	96

5. DISCUSIÓN.....	100
6. CONCLUSIONES.....	119
7. BIBLIOGRAFÍA.....	120
8. ANEXO: Publicaciones.....	130

ABREVIATURAS

AcM(s)	anticuerpo(s) monoclonale(s)
BSA	albúmina de suero bovino
CME	componentes de la matriz extracelular
CNBr	bromuro de cianógeno
Col	colágeno
IIICS	segmento de conexión de tipo III
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-2(β -aminoetil eter) tetraacético
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FAK	kinasa de los focos de adhesión
FCS	suero fetal bovino
FITC	isotiocianato de fluoresceína
Fn	fibronectina
Hepes	ácido 2-(4-(2hidroxiethyl)-piperanicil-1)- etanosulfónico
kDa	kilodalton
Ln	laminina
OPD	1,2-phenylendiamine
PBS	tampón fosfato salino
PdBu	forbol dibutirato
PKC	protína kinasa C
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PMA	forbol miristato acetato
RGD	Arginina-Glicina-Aspártico
RPMI	medio <i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
SDS	dodecilsulfato sódico
TGF- β	factor de crecimiento transformante- β
TNF	factor de necrosis tumoral
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
TRITC	

1. INTRODUCCIÓN

Las moléculas de adhesión son proteínas de la membrana plasmática que van a mediar adhesión celular, bien sea entre células o entre células y componentes de la matriz extracelular. Estas interacciones celulares van a ser clave en determinar: la posición espacio-temporal celular, la expresión génica organo-específica y la proliferación celular. Las moléculas de adhesión van a intervenir en procesos fisiológicos tales como: embriogénesis, coagulación sanguínea, diferenciación celular, inflamación y respuesta inmune; y fenómenos patológicos como trombosis y metástasis tumoral.

FAMILIAS DE MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

La mayoría de las moléculas de adhesión se pueden clasificar en cuatro familias:

- 1.- Cadherinas
- 2.- Selectinas
- 3.- Inmunoglobulinas
- 4.- Integrinas

1.-CADHERINAS

Las cadherinas son una familia de moléculas de adhesión dependientes de calcio, que intervienen fundamentalmente en la organización tisular mediando adhesión homotípica celular (Takeichi, M. 1991). Tienen un papel importante en procesos de morfogénesis durante el desarrollo y se ha visto que en adultos la pérdida de la expresión de la cadherina en tumores epiteliales está asociado con un fenotipo más maligno e invasivo (Rosales y col. 1995).

Las cadherinas se han clasificado en dos grupos: 1) Las cadherinas N, P, R, B y E se localizan en las uniones de tipo

adherente y forman asociaciones con el citoesqueleto de actina. 2) Las desmoglinas y desmocollinas son un grupo de cadherinas asociadas a desmosomas que pueden asociarse a filamentos intermedios (Mechanic y col. 1991).

Estructuralmente se caracterizan por tener un extremo amino-terminal extracitoplásmico compuesto por la repetición de un segmento hasta un total de cinco veces, un segmento de transmembrana y el extremo carboxi-terminal citoplásmico de aproximadamente 150 aminoácidos (**fig. 1**). La función de adhesión de las cadherinas se localiza en el segmento más amino-terminal, mientras que los otros segmentos repetidos homólogos contienen los sitios de unión de calcio. El dominio citoplásmico de las cadherinas se unen a un grupo de proteínas intracelulares conocidas como cateninas a través de las cuales se unirán a los respectivos componentes del citoesqueleto (Gumbiner y col. 1993, Rosales y col. 1995).

2.-SELECTINAS

Las selectinas son moléculas de adhesión dependientes de calcio, que se caracterizan por poseer un dominio de tipo lectina. Son las primeras moléculas que intervienen, mediando la unión intercelular heterotípica, en el rodamiento de los leucocitos y plaquetas sobre las células endoteliales en los procesos de inflamación (McEver, R.P. 1994, Rosales y col. 1995).

La estructura de las selectinas (**fig. 1**) incluye: un extremo amino-terminal de 117-120 aminoácidos homólogo a un dominio de tipo lectina dependiente de calcio, un motivo de 34-40 aminoácidos del tipo del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y cortos dominios repetidos (de dos a nueve veces) de 62 aminoácidos con capacidad reguladora del complemento; un segmento de transmembrana y un corto extremo citoplásmico (Springer, T.A. 1990).

Hasta ahora tres moléculas se han descrito en esta familia: 1) Selectina-L (CD 62L o LAM-1) está expresada constitutivamente en

la mayoría de los leucocitos y contribuye a la migración celular hacia el foco infeccioso. 2) Selectina-E (CD 62E o ELAM-1) se expresa transitoriamente en células endoteliales después de la estimulación con LPS, endotoxina y otras citoquinas como IL-1 y TNF- α . 3) Selectina-P (CD 62P, PADGEM o GMP-140) se encuentra almacenada en los gránulos α de plaquetas y en los cuerpos Weibel-Palade de las células endoteliales y puede ser rápidamente movilizada a la superficie celular, previa estimulación por productos de la cascada de la coagulación sanguínea, tales como trombina, donde va a mediar adhesión de neutrófilos y monocitos (Rosales y col. 1995, Springer, T.A. 1990, Carlos, T.M. 1994). La selectina-P y el factor von Willebrand (vWF) son los únicos constituyentes que se colocan en los cuerpos Weibel-Palade de las células endoteliales. El almacenaje de la selectina-P es independiente del vWF, ya que contiene su propia señal para ser reconocida por estos orgánulos para su almacenaje (Koedam y col. 1992).

Las selectinas reconocen como ligandos motivos sialilados, fucosilados y sulfatados (con excepción de la selectina-E) que pueden aparecer formando parte de glicolípidos o glicoproteínas. La selectina-E reconoce el tetrasacárido fucosilado sialil Lewis X (SLe^x, CD 15s) expresado en neutrófilos monocitos y células asesinas (natural killer, NK) y el isómero sialil Lewis A (SLe^a) que se expresa en células tumorales. Otro ligando es el antígeno que expresan los linfocitos cutáneos (CLA) con una estructura sialilada y fucosilada similar al SLe^x. La selectina P y L reconocen como ligandos el SLe^x, SLe^a y el trisacárido Le^x (CD 15), así como diferentes glicolípidos y polisacáridos sulfatados como la heparina.

Los ligandos glicoproteicos de las selectinas descritos hasta ahora son: la glicoproteína homóloga a la mucina, ligando de la selectina P (PSGL-1); GlyCAM (molécula de adhesión dependiente de glicosilación-1), CD 34 (sialomucina) y MAdCAM son ligandos para la selectina L (Springer 1990, 1994 y 1995; Carlos y Harlan, 1994; Rosales y col. 1995; Butcher y Picker, 1996).

3.-SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Los miembros de esta superfamilia se caracterizan por compartir el dominio inmunoglobulina, que consiste en una estructura de 90-100 aminoácidos organizados en una conformación de dos hojas plegadas- β antiparalelas estabilizadas por puentes disulfuro. A este grupo pertenecen moléculas de muy diversa función. Moléculas que intervienen en la respuesta inmune: moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), CD2, CD4, CD8 y LFA-3, y otras moléculas con una función más específica de adhesión intercelular: molécula de adhesión intercelular-1 o ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD???), molécula de adhesión de células endoteliales o VCAM-1 (CD106), molécula de adhesión celular de plaquetas y células endoteliales o PECAM-1 (CD31), CD22, N-CAM, MadCAM (Postigo y Sanchez-Madrid, 1993; Carlos y Harlan, 1994).

ICAM-1 se expresa en leucocitos, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales. Tiene cinco dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico de 28 aminoácidos unido al citoesqueleto de actina mediante α -actinina. Es ligando para LFA-1 (primer dominio de inmunoglobulina) y Mac-1 (tercer dominio de inmunoglobulina). ICAM-1 también es receptor para rinovirus, concretamente en el primer dominio de inmunoglobulina sin solaparse con la región que une LFA-1 (Springer, 1990).

ICAM-2 se expresa constitutivamente en el endotelio vascular y esta implicada en la adhesión leucocitaria. Tiene dos dominios de tipo inmunoglobulina y es ligando de LFA-1.

El aumento de expresión de ICAM-1 en células endoteliales por causa de citoquinas inflamatorias, le proporciona un papel importante a esta molécula en procesos de extravasación leucocitaria a sitios de inflamación; mientras que la expresión constitutiva de ICAM-2 por las células endoteliales debe ser

importante en la recirculación linfocitaria a sitios no inflamatorios. ICAM-1, ICAM-2 y ICAM-3 también son moléculas que contribuyen en respuestas inmunes mediando adhesión a LFA-1 en respuestas antígeno-específica de células T (Carlos y Harlan, 1994; Springer, 1995).

VCAM-1 es una molécula que se expresa en células endoteliales activadas por citoquinas inflamatorias y va a mediar la adhesión firme de los leucocitos, mediante VLA-4, al endotelio para su posterior extravasación hacia el foco infeccioso. Por "splicing" o procesamiento alternativo del RNA mensajero de VCAM-1 se encuentran tres formas según el número de dominios de tipo inmunoglobulina: siete (7D), seis (6D) y tres dominios (3D). VCAM-1 es un ligando para la integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) y muy débilmente para $\alpha 4\beta 7$. En las tres isoformas de VCAM-1 el sitio de unión de VLA-4 es el dominio 1 de inmunoglobulina exceptuando la isoforma de siete dominios que también es el dominio 4 (Carlos y Harlan, 1994; Springer, 1995).

MAdCAM-1 se encuentra en el endotelio alto de las vénulas de la mucosa de los nódulos linfáticos (por ejemplo Placas de Peyer) y está implicada en el rodamiento y recirculación de los linfocitos a través del endotelio. MAdCAM-1 contiene tres dominios inmunoglobulina y una región homóloga a la mucina entre los dominios 2 y 3. MAdCAM-1 tiene una función dual mediando adhesión por un lado a $\alpha 4\beta 7$ y por otro a la selectina-L (dominio homólogo a la mucina) (Carlos y Harlan, 1994; Springer, 1995).

PECAM-1 o CD31 esta ampliamente distribuida en leucocitos, plaquetas y en células endoteliales (en la superficie y formando parte de las uniones intercelulares entre las células endoteliales). CD31 presenta seis dominios de tipo inmunoglobulina y se caracteriza por mediar adhesión tanto homofílica (CD31-CD31) como heterofílica (CD31- $\alpha v\beta 3$) contribuyendo en procesos de migración de los leucocitos a través del endotelio y en el mantenimiento de la barrera de permeabilidad endotelial durante este proceso (Carlos y Harlan, 1994; Springer, T.A. 1995; Piali y col. 1995).

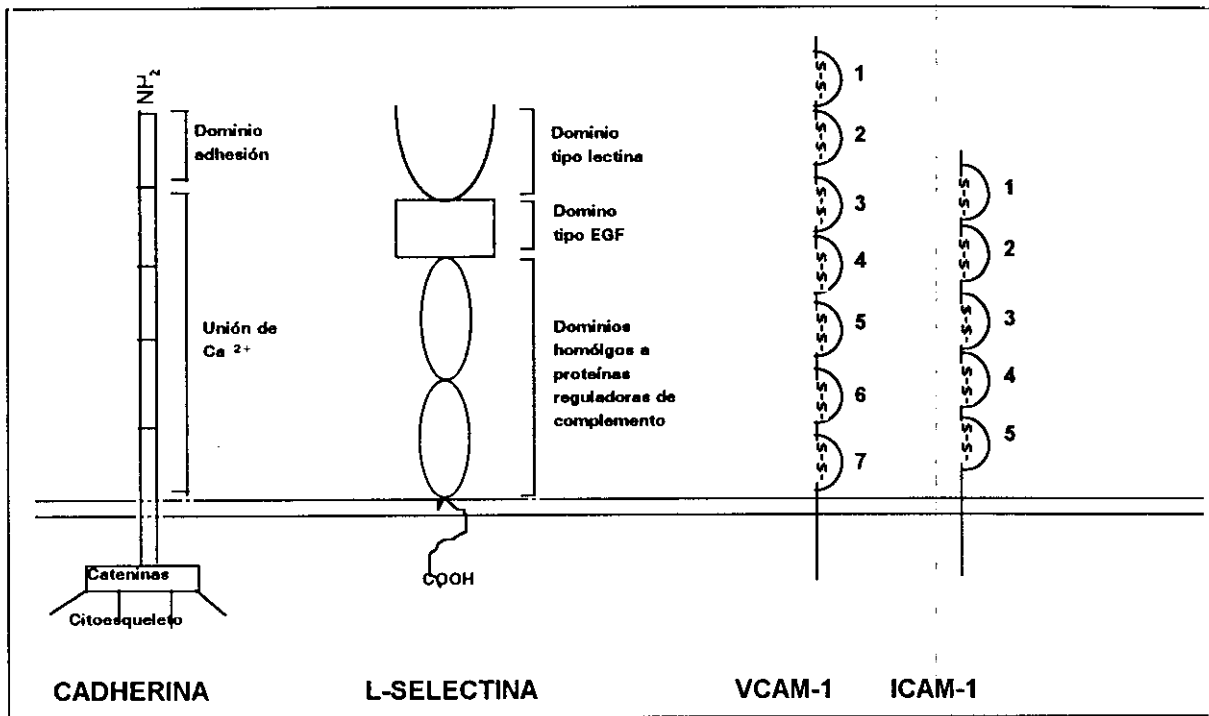


Figura 1. Estructuras de algunos representantes de las siguientes familias de las moléculas de adhesión: cadherinas, selectinas e inmunoglobulinas con sus miembros ICAM-1 y VCAM-1. Las características de cada una se describen en el texto.

4.-INTEGRINAS

Las integrinas constituyen una familia de moléculas de adhesión que participan en numerosos y complejos procesos biológicos, que incluyen migración celular, organización tisular, crecimiento celular, coagulación sanguínea, inflamación, dianas de reconocimiento para linfocitos T y diferenciación de muchos tipos celulares.

El término "integrina" fue propuesto por Richard Hynes (Hynes, 1987) para abarcar en un grupo, a moléculas de características similares con capacidad de integrar el medio extracelular con el intracelular, transfiriendo información en ambos sentidos. De tal manera que la interacción de las integrinas

con sus ligandos pueda generar señales intracelulares que induzcan cambios en la morfología celular, expresión de genes y proliferación celular. Por otro lado, el estado de la activación celular sea capaz de regular la actividad funcional de estos receptores en términos de afinidad por sus ligandos.

Las integrinas son una familia de moléculas heterodiméricas glicoproteicas (α/β) de transmembrana celular que actúan mediando adhesión célula-célula o entre células y componentes de la matriz extracelular (CME). La familia de las integrinas comprenden al menos 23 miembros diferentes y están formadas por la asociación no covalente de una subunidad α , de mayor peso molecular, y una subunidad β . Las integrinas se clasificaron originalmente en tres subfamilias basándose en que varias subunidades α se asociaban específicamente a una subunidad β común. Pero esta clasificación es cada vez más compleja debido a la aparición de nuevas subunidades β y a que algunas de las subunidades α pueden asociarse a diferentes subunidades β . Actualmente las integrinas se pueden clasificar en cuatro subfamilias: 1) integrinas $\beta 1$ o VLA, 2) integrinas $\beta 2$ o leucocitarias, 3) integrinas $\beta 3$ o citoadhesinas, 4) integrinas $\beta 7$ o receptores "homing", y un grupo heterogéneo 5) donde se incluyen otras integrinas (Hynes, 1992; Postigo y Sánchez-Madrid, 1993; Giancotti y Mainiero, 1994).

1) Las integrinas $\beta 1$ o VLA pueden asociarse con diez diferentes subunidades α y son receptores para componentes de la matriz extracelular (CME), así como para ligandos celulares. Esta subfamilia es el objetivo de la Tesis Doctoral y la haremos mención especial más adelante (tabla 1).

2) Las integrinas $\beta 2$ (CD18) o leucocitarias se encuentran distribuida exclusivamente en las células del sistema inmune y son fundamentales e imprescindibles para su correcta funcionalidad. En situaciones de inflamación y de daño a tejidos median la adhesión

(junto con otras moléculas) de los linfocitos al endotelio y su posterior extravasación. En procesos de citotoxicidad de linfocitos a células extrañas o tumorales es imprescindible la interacción de ambos tipos celulares mediada por integrinas $\beta 2$.

Esta subfamilia comprende tres miembros: la molécula asociada a la función linfocitaria-1 LFA-1 (CD18/CD11a, $\alpha L\beta 2$), Mac-1 (CD18/CD11b, $\alpha M\beta 2$) y gp150,95 (CD18/CD11c, $\alpha X\beta 2$). Recientemente se ha descrito un cuarto miembro $\alpha D\beta 2$ (Wong y col. 1996). Los ligandos de estas moléculas son miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresados sobre otras células: ICAM-1, ICAM-2 y ICAM-3 (LFA-1 y Mac-1); y otros factores solubles, como el factor de complemento iC3b y fibrinógeno (tabla 1).

La importancia de las integrinas leucocitarias en procesos fisiológicos esta ilustrada por los cuadros patológicos que presentan la enfermedad conocida como la deficiencia de la adhesión leucocitaria congénita (LAD), que se caracteriza por mutaciones en la subunidad $\beta 2$ (Anderson, 1985; Springer, 1990; Carlos y Harlan, 1994).

3) Las integrinas de la subfamilia $\beta 3$ o citoadhesinas (tabla 1), están formadas por la glicoproteína de plaquetas IIb/IIIa ($\alpha IIb\beta 3$) y el receptor para vitronectina ($\alpha v\beta 3$). La unión de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ a sus ligandos fibrinógeno y el factor de von Willebrand va a desencadenar la agregación plaquetaria y posterior coagulación sanguínea (Phillips y col. 1991). La trombastenia de Glanzmann, es una enfermedad que se caracteriza por la alteración de la integrina $\alpha IIb\beta 3$, poniendo de manifiesto la importancia de esta molécula en procesos de coagulación sanguínea. El receptor para vitronectina $\alpha v\beta 3$ tiene una amplia distribución en células de origen mesenquimático y tiene como otros ligandos: fibrinógeno, trombospondina, el factor de von Willebrand, etc. Este receptor puede intervenir en interacciones intercelulares, siendo la interacción con estos ligandos dependientes de péptidos RGD. La integrina $\alpha v\beta 3$ juega un papel importante en procesos de

angiogénesis, permitiendo la interacción entre las células vasculares estimuladas por factores de crecimiento liberados por los tumores o los tejidos dañados e inhibiendo la apoptosis de esas células vasculares (Varner y col. 1995). También se ha visto la coexpresión de la integrina $\alpha v \beta 3$ con la metaloproteinasa MMP-2 en la superficie de células tumorales invasivas (melanomas) y en la superficie de los vasos sanguíneos angiogénicos, dando una posible explicación a la degradación de la matriz extracelular y migración celular facilitando la invasión celular (Brooks y col. 1996). La subunidad αv se puede asociar con más de una subunidad β (tabla 1) resultando en la formación de receptores con diferentes especificidades de ligando (Albelda y Buck, 1990; Giancotti y Mainiero, 1994).

4) Las integrinas $\beta 7$ se expresan exclusivamente en leucocitos y están implicadas en el "homing" linfocitario. Hay dos miembros de esta subfamilia: $\alpha 4 \beta 7$ ($\alpha 4 \beta p$) y $\alpha E \beta 7$ ($\alpha HML \beta 7$) y un posible tercer miembro reconocido por el AcM OX-62. $\alpha 4 \beta 7$ interviene en el "homing" de células T, uniéndose a su ligando MadCAM-1 en el alto endotelio de las placas de Peyer (mucosa intestinal). $\alpha 4 \beta 7$ también es capaz de unir VCAM-1 y la región CS-1 de fibronectina. $\alpha E \beta 7$ es otro receptor "homing" expresado en linfocitos intraepiteliales (Hogg y Landis, 1993).

5) En este apartado se incluyen un grupo heterogéneo de miembros de las integrinas que se han caracterizado recientemente con la aparición de nuevas subunidades β asociándose con nuevas subunidades α u otras ya caracterizadas. En la tabla 1 se muestran cuales son estos miembros y sus ligandos descritos.

SUBUNIDAD β	SUBUNIDAD α	LIGANDOS
$\beta 4$	$\alpha 6$	Kalinina, merosina, laminina ($\beta 4$)
	$\alpha 1$	Laminina, merosina ($\beta 1$)
	$\alpha 2$	Colágeno, laminina
	$\alpha 3$	Colágeno, laminina
	$\alpha 3$	Colágeno, laminina, fibronectina
	$\alpha 5$	Fibronectina (RGD)
	$\alpha 7$	Laminina
	$\alpha 8$	Fibronectina, Laminina, Tenascina-C
	$\alpha 9$	Laminina, colágeno, osteopontina
	$\alpha 4$	Fibronectina, VCAM-1, $\alpha 4$
$\beta 7$	αIEL	?
		Fibronectina ($\beta 1$)
$\beta 5$		Vitronectina ($\beta 5$)
$\beta 6$	αv	Fibronectina ($\beta 6$)
$\beta 8$? ($\beta 8$)
$\beta 3$		Vitronectina, fibrinógeno, fibronectina, trombospondina, factor Von Willebrand ($\beta 3$)
	αIIb	Fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, factor Von Willebrand, trombospondina
	αL	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	αM	ICAM-1, fibrinógeno, componente C3b del complemento inactivo, factor Xcoagulación
$\beta 2$	αX	Fibrinógeno, componente C3b del complemento inactivo

Tabla 1. Clasificación de los miembros pertenecientes a las distintas subfamilias de las integrinas y sus ligandos caracterizados.

INTEGRINAS $\beta 1$ (CD29) o VLA

Las integrinas VLA (*very late antigen*) reciben este nombre por que los primeros miembros se describieron como antígenos que aparecían en linfocitos en cultivo varios días después de la activación con mitógenos. La subfamilia de las integrinas VLA o $\beta 1$ está muy ampliamente distribuida en la mayoría de los tipos celulares y son receptores celulares para componentes de la matriz extracelular como colágeno, fibronectina, laminina y vitronectina, además de VLA-4 que reconoce fibronectina y también un ligando intercelular (VCAM-1) sobre la superficie de células endoteliales activadas por citoquinas. Hasta ahora se han descrito diez subunidades α distintas asociadas a la subunidad $\beta 1$ común.

***VLA-1, $\alpha 1\beta 1$ o CD49a/CD29:** originalmente se describió sobre linfocitos T como un antígeno de aparición muy tardía (2-4 semanas) después de la activación con mitógenos o aloantígenos. Posteriormente se detalló su expresión sobre otros muchos tipos celulares, como por ejemplo melanomas y neuroblastomas. VLA-1 media adhesión a colágeno y laminina. Su peso molecular es en condiciones reductoras 210kDa/130kDa y en no reductoras 200kDa/110kDa. El sitio principal de unión de laminina y colágeno a está localizado en el dominio I de la cadena $\alpha 1$ (Calderwood y col. 1997).

La adhesión a colágeno y/o laminina vía VLA-1 interviene en procesos de captación de células T tanto en el pulmón en individuos normales, como en el líquido sinovial en casos de artritis reumatoide (Hemler, 1990).

En varios trabajos se ha puesto de manifiesto el papel fundamental para VLA-1 en procesos de diferenciación y función celular, como por ejemplo la sobreexpresión de VLA-1 en líneas de neuroblastoma humanas, o la pérdida de expresión en caso de fibroblastos transformados de roedores. En varios de estos casos los cambios en la expresión de VLA-1 vienen acompañados de cambios opuestos en los niveles de VLA-2 y/o VLA-3. La expresión diferencial del heterodímero VLA-1 por parte de las células

endoteliales de diferentes tipos de vasos sanguíneos, y la regulación de la expresión en presencia de citoquinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), sugiere un papel específico de esta integrina en la función endotelial (Hemler, 1990; Defilippi y col. 1991).

***VLA-2, $\alpha 2\beta 1$ o CD49b/CD29:** se describió inicialmente en linfocitos T con un largo tiempo de activación. Después se encontró en plaquetas y otras líneas celulares. Su peso molecular es 165kDa/130kDa en condiciones reductoras y de 160kDa/110kDa en condiciones no reductoras. VLA-2 es receptor para colágeno y laminina, aunque la capacidad de unión a cada ligando es dependiente del tipo celular que se trate (Hemler, 1990).

Tanto para VLA-1 como VLA-2 el sitio principal de unión de colágeno está localizado en los dominio I de las respectivas subunidades α (Calderwood y col. 1997).

***VLA-3, $\alpha 3\beta 1$ o CD49c/CD29:** tiene un peso molecular de 150kDa/110kDa en condiciones no reductoras. Los ligandos de VLA-3 son: colágeno, fibronectina, laminina y Kalinina. La expresión de VLA-3 es dependiente de la línea celular que se estudie, pero esta relacionada positivamente con la adherencia de las células a un sustrato. De tal manera que la pérdida de adherencia de esas células o células que crecen en suspensión tienen niveles bajos de VLA-3 (Hemler, 1990; Giancotti y Mainiero, 1994).

***VLA-4, $\alpha 4\beta 1$ o CD49d/CD29:** la subunidad $\alpha 4$ puede sufrir un corte proteolítico en su extremo C-terminal dando lugar a formas no cortadas de 150kDa de peso molecular, así como dos fragmentos de 80kDa (N-terminal) y 70kDa (C-terminal). Se expresa en una gran variedad de células como melanomas, células T, Células B, monocitos y células derivadas de estas. VLA-4 media adhesión a fibronectina (RGD-independiente) y adhesión intercelular a través de VCAM-1 expresado sobre el endotelio activado por citoquinas (Albelda y Buck, 1990; Hemler, 1990).

VLA-4 tiene un papel en el proceso de citolisis interviniendo en la interacción heterotípica entre células T-citolíticas y células B diana. VLA-4 también media adhesión homotípica entre líneas celulares T o B. En procesos inflamatorios, VLA-4 expresado en linfocitos (junto con otras moléculas de adhesión) es capaz de inducir adhesión firme a VCAM-1 expresado sobre el endotelio, y favorecer la migración hacia el foco infeccioso donde se desarrollará la respuesta inmune adecuada (Campanero y col. 1990; Hemler, 1990). En los mismos procesos se ha visto que VLA-4 es capaz de mantener el rodamiento de linfocitos sobre VCAM-1 purificado o expresado sobre endotelio activado (Alon y col. 1995). También se ha implicado el par de adhesión VLA-4-VCAM-1 en la miogénesis (Rosen y col. 1992) y en la inhibición de la metástasis tumoral en células de melanoma (Qian y col. 1994).

$\alpha 4$ también puede unirse a $\beta 7$ formando el receptor "homing" anteriormente mencionado. Tanto las integrinas $\alpha 4\beta 7$ como $\alpha 4\beta 1$ son capaces de unirse a la subunidad $\alpha 4$ sobre la superficie de otras células, lo que sugiere un papel novedoso en la regulación de las interacciones de los linfocitos durante las respuestas inmunes (Altevoigt y col. 1995).

***VLA-5, $\alpha 5\beta 1$ o CD49e/CD29:** es el receptor "universal" para fibronectina (RGD-dependiente). Esta ampliamente distribuido y su peso molecular es en condiciones reductoras de 155kDa/110kDa. Recientemente se ha descrito un ligando celular para VLA-5 denominado L1, que es una inmunoglobulina de transmembrana celular que se distribuye en células inmunes y neuronales (Ruppert y col. 1995).

VLA-5, entre otras funciones, se ha relacionado con la maduración y activación de leucocitos. Por otro lado, VLA-5 se ha visto implicado en ciclos de endocitosis-exocitosis, sugiriendo un mecanismo por el cual VLA-5 podría ser repuesto en el borde de una célula en movimiento de tal manera que sería capaz de generar nuevas adhesiones y así facilitar la migración celular (Hemler, 1990).

***VLA-6, $\alpha 6\beta 1$ o CD49f/CD29:** está ampliamente distribuida, y es receptor para laminina y merosina. Su peso molecular es de 140kDa/110kDa en condiciones no reductoras. Los fragmentos de reconocimiento de VLA-6 en la laminina son distintos a los que utiliza VLA-1 (Hall y col. 1990).

$\alpha 6$ también se asocia con la subunidad $\beta 4$, teniendo como ligandos laminina, merina y Kalinina (Hemler y col. 1989; Hemler, 1990; Giancotti y Mainiero, 1994).

***VLA-7 o $\alpha 7\beta 1$,** receptor para laminina.

***VLA-8 o $\alpha 8\beta 1$** es receptor para fibronectina, vitronectina y tenascina-C (Schnapp y col. 1995). Se expresa en muchos órganos en desarrollo y particularmente en el riñón, donde juega un papel importante en las interacciones entre las células epiteliales y mesenquimáticas (Müller y col. 1995).

***VLA-9 o $\alpha 9\beta 1$** está expresada por un gran número de tejidos y es receptor para colágeno y laminina de una manera RGD-independiente (Forsberg y col. 1994). Recientemente se ha caracterizado una forma de unión dependiente de péptidos RGD con el dominio N-terminal de la molécula osteopontina, que es una glicoproteína adhesiva implicada en numerosas enfermedades asociadas con inflamación (Smith y col. 1996).

*** $\alpha v\beta 1$ o CD51/CD29** es receptor para fibronectina. αv se puede unir a varias subunidades β ($\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 8$ y $\beta 3$) conferiéndole distintas especificidades de ligando (Giancotti y Maniero, 1994).

ESTRUCTURA DE LAS INTEGRINAS

Las integrinas están formadas por la asociación no covalente de una subunidad α y una subunidad β . Ambas subunidades son glicoproteínas de transmembrana formadas por un extremo C-terminal

intracitoplásmico, que puede asociarse o no con el citoesqueleto de actina a través de las proteínas talina, vinculina o α -actinina, una región muy corta hidrofóbica de transmembrana y una larga región N-terminal extracelular.

1) Subunidades α . El extremo N-terminal está constituido por la repetición, hasta un total de siete veces, de un segmento homólogo con el dominio de unión de cationes divalentes mano-EF (EF-hand). En realidad solo los dominios 4-7, y en algunos casos 5-7, son los que guardan mayor similitud y son los que le van a conferir la propiedad de unir cationes divalentes, condición indispensable para la funcionalidad de las integrinas. Estos módulos están compuestos por 12 aminoácidos que contienen 5 o 6 residuos oxigenados que sirven como sitios coordinadores de calcio en otras proteínas como calmodulina, troponina-C y parvalbúmina. También se ha sugerido que esta región sea el sitio físico importante para la unión de las integrinas a sus ligandos (Tuckwell y col. 1993; Sánchez-Mateos y col. 1996).

Ciertas subunidades α : α_1 , α_2 , α_L , α_M y α_X , contienen un dominio intercalado entre los dominios 2 y 3 de EF-hand, conocido como dominio-insertado o dominio-I. Este dominio-I (180-200 aminoácidos) es homólogo al dominio-A del factor de von Willebrand. Este motivo se ha encontrado en otras proteínas, tales como la proteína de la matriz del cartílago, factor B y colágeno VI donde se ha implicado en unión de colágeno y moléculas del complemento. Hay dos hipótesis acerca de la función del dominio-I: 1) pueda ser un elemento meramente estructural o 2) que pueda intervenir en la unión de iones metálicos y en la unión del ligando (Tuckwell y col. 1993; Hogg y col. 1994; Kern y col. 1994; Calderwood y col. 1997).

Las subunidades α que no poseen el dominio I: α_3 , α_4 , α_5 , α_6 , α_7 , α_8 , α_{IIb} y α_v presentan un sitio de escisión de proteasas, que se encuentra entre los dominios EF-hand y la región de transmembrana. es el resultado de una división post-transduccional en un sitio conservado dando lugar a dos cadenas unidas covalentemente por un puente disulfuro (fig. 2). α_4 presenta un

sitio de división alrededor de la mitad de la molécula dando lugar a dos fragmentos de 80kDa y 70kDa de peso molecular (Hemler, 1990; Tuckwell y col. 1993).

El dominio citoplásmico es corto de aproximadamente 30 aminoácidos y juega un papel importante en la regulación de la función de las integrinas (Tuckwell y col. 1993)

2) Subunidades β . Las subunidades β de las integrinas están compuestas por alrededor de 800 residuos, excepto $\beta 4$ que es más larga debido a su extremo citoplásmico. En el extremo N-terminal, correspondiente a la región extracelular, se encuentra un segmento de 200 aminoácidos que está altamente conservado entre las distintas subunidades β y es la región implicada en la unión al ligando. En esta región la subunidad β puede presentar un sitio de unión de cationes divalentes (Loftus y col. 1990; Tuckwell y col. 1993; Lin y col. 1997).

En la región C-terminal del dominio extracelular se encuentra una región rica en cisteínas (posible puentes disulfuro) formada por cuatro dominios homólogos al factor de crecimiento epidérmico (EGF). La caracterización bioquímica sugiere que la porción amino-terminal de la molécula está plegada en forma de lazo, estabilizado por puentes disulfuro formados entre cisteínas cercanas al amino-terminal con otras situadas en el primer dominio repetido rico en cisteínas (**fig. 2**). El extremo citoplásmico puede asociarse con el citoesqueleto de actina a través de las proteínas talina, vinculina o α -actinina (Albelda y Buck, 1990; Hynes, 1992; Tuckwell y col. 1993).

Se han observado variabilidad en las subunidades β correspondientes a la misma subfamilia debido al "splicing" alternativo en regiones extracelulares de $\beta 7$ y citoplásmicas de $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ (Tuckwell y col. 1993; Languino y Ruoslahti, 1992).

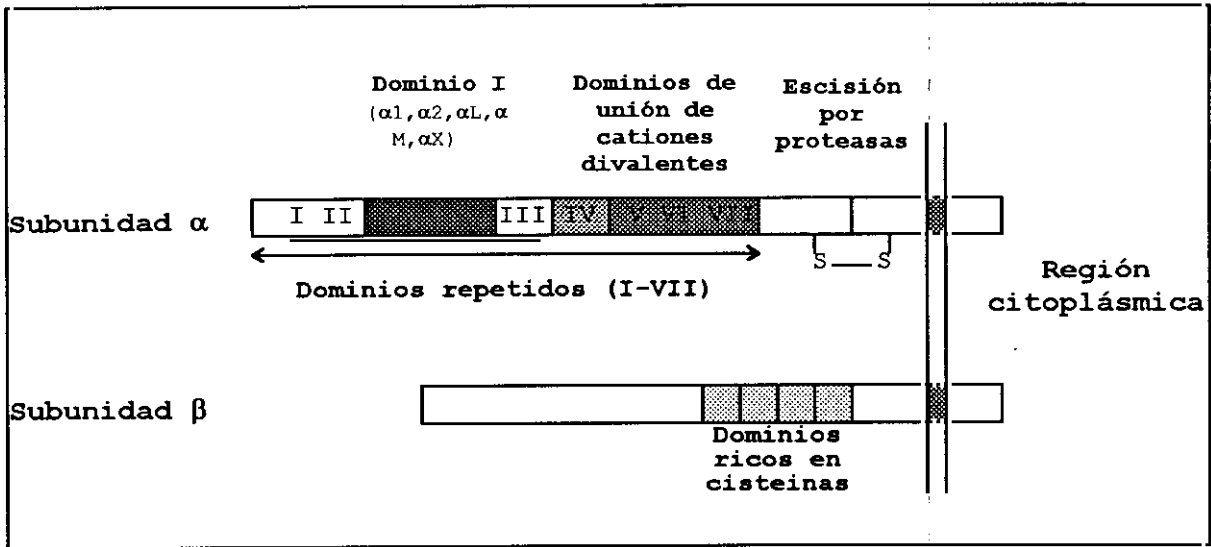


Figura 2. Representación estructural de los dominios que forman las subunidades α y β de las integrinas.

3) El heterodímero integrina. La asociación de una subunidad α con una subunidad β para formar el heterodímero integrina es dependiente de cationes divalentes y parece ser mediada predominantemente por los dominios extracelulares de las dos subunidades. Estudios de microscopía electrónica han mostrado que el heterodímero tiene una cabeza globular sostenida por dos tallos que se extienden hasta la membrana plasmática. Este modelo implica que la cabeza globular está formada por los extremos amino-terminal de ambas subunidades conteniendo el sitio de contacto con el ligando y los sitios de unión de cationes divalentes. Excepcionalmente, en algunos casos el ligando se une a una región de tipo EF-hand de la subunidad α , sin intervención de la subunidad β (Weisel y col.1992; Tuckwell y col.1993). Al microscopio electrónico, se observa colocalización de los extremos citoplásmicos de las integrinas y citoesqueleto, pudiendo llegar a formar focos de adhesión. Estas estructuras representan la asociación del extremo citoplásmico de las integrinas al citoesqueleto de actina a través de proteínas del citoesqueleto como talina, vinculina y α -actinina (fig.3). Una excepción es la integrina $\alpha 6 \beta 4$, cuya subunidad β tiene un largo dominio

citoplásmico, que interacciona con filamentos intermedios asociados a hemidesmosomas. Más adelante veremos el flujo bidireccional de información a través de estas estructuras (Hynes, 1992).

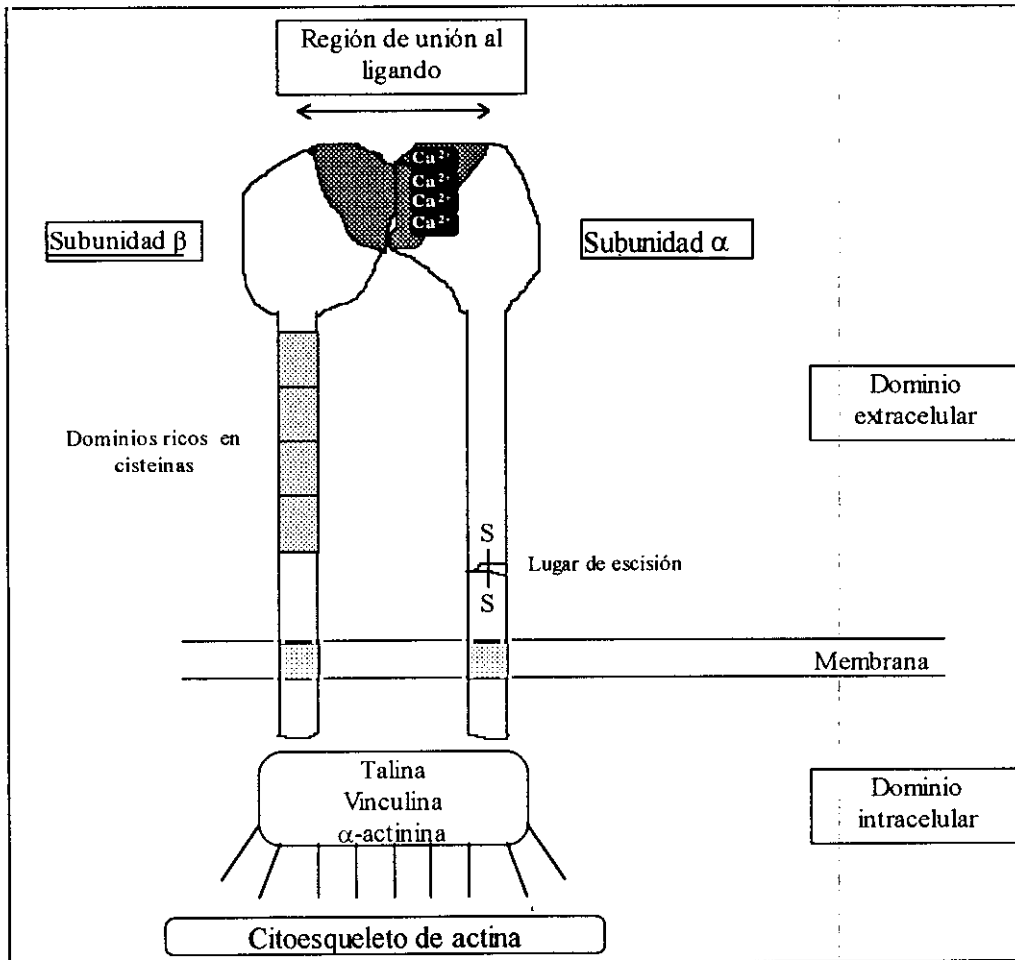


Figura 3. Esquema bidimensional de una molécula de integrina dispuesta sobre la superficie celular.

REGULACIÓN FUNCIONAL DE LAS INTEGRINAS

Las integrinas se pueden encontrar sobre la superficie celular en diferentes estados de activación, lo que representa que las integrinas van a tener distintas capacidades de unirse a sus

respectivos ligandos, al contrario de lo que ocurre con otras moléculas que por el mero hecho de presentarse en la superficie celular van a tener la capacidad de realizar sus funciones. Todo esto sugiere que la unión de las integrinas con sus respectivos ligandos es reversible, y va a necesitar de la activación de las integrinas para que se produzca una interacción estable. La activación de las integrinas requiere de un metabolismo celular activo, como se demuestra utilizando bloqueadores de la producción de ATP celular o temperaturas más bajas que la fisiológica, y citoesqueleto intacto. La activación de las integrinas puede ser modificada tanto por estímulos extracelulares como intracelulares (Campanero y col. 1990; Dransfield y col. 1990; Hogg y col. 1994).

La activación de las integrinas se refleja en un incremento en la afinidad de la integrina por el ligando y puede ser debido a un cambio conformacional directo sufrido por el receptor que favorece la interacción con el ligando. Hay varios tipos de estímulos, tanto extracelulares como intracelulares, que son capaces de inducir ese aumento en la afinidad de la integrina por el ligando.

Independientemente del grado de activación de las integrinas, **la adhesión celular** a ligandos de integrinas va depender de la relación entre la afinidad de las integrinas y la avidéz celular. El incremento en la avidéz es debido al reagrupamiento de los receptores o "clustering" y/o posterior aplanamiento celular o "spreading" sobre el sustrato. En este caso, el aumento de la adhesión celular va a ser debido simplemente por el incremento en la probabilidad de las interacciones integrina-ligando, sin afectar a la afinidad del receptor. En este reagrupamiento intervienen proteínas del citoesqueleto asociadas a las integrinas. En ensayos *in vitro* se utilizan los ésteres de forbol para inducir este efecto sugiriendo la actuación de enzimas de tipo kinasas (al menos la proteína kinasa C).

Conclusión: la adhesión celular mediada por integrinas va a depender de una relación favorable, impuesta tanto por estímulos intracelulares como extracelulares, entre avidéz/afinidad: las

integrinas pueden encontrarse en un estado de baja afinidad, pero puede inducirse tal aumento en la avidéz celular que sea capaz de ejercer un efecto neto de adhesión celular; o la adhesión puede venir mediada directamente por una alta afinidad de las integrinas por sus ligandos.

Las integrinas no funcionan meramente como receptores de adhesión celular, sino que juegan un papel muy importante en la señalización bidireccional con el microambiente extracelular. Un tipo de señalización es la que va en el sentido extra-intracelular (outside-in) y se refiere a aquellos eventos fisiológicos que son descargados hacia el interior celular a partir de la interacción integrina-ligando. Algunos de estos incluyen el reagrupamiento (*clustering*) de las integrinas en contactos focales, fosforilación de proteínas intracelulares, cambios en el pH intracelular e incremento en la transcripción génica. Un segundo tipo de señalización es intra-extracelular (inside-out), se refiere al hecho de que agentes solubles extracelulares van a ser capaces de modificar la actividad de las integrinas uniéndose a sus receptores celulares seguido de los clásicos sistemas de señalización intracelular (Stuiver y O'Toole, 1995).

1) ACTIVACIÓN DE LAS INTEGRINAS POR ESTÍMULOS EXTRACELULARES.

Los estímulos extracelulares que afectan directamente a la activación de las integrinas a través de un cambio conformacional, son los siguientes:

- *Cationes divalentes
- *AcM
- *Activación por sus propios ligandos
- *Activación por proteólisis

a) Cationes divalentes

La correcta funcionalidad de las integrinas, como la capacidad de interacción integrina-ligando y localización celular, depende de la presencia de cationes divalentes en el medio

extracelular. Estos iones se van a unir a los dominios V-VII o IV-VII y posiblemente al dominio I de la subunidad α , en algunos casos a la subunidad β . Como regla general, aunque hay excepciones, el Mg^{2+} , en un rango de concentraciones de milimolar, va a inducir la activación de las integrinas favoreciendo la unión integrina-ligando, mientras que el Ca^{2+} o la ausencia total de cationes divalentes va a inactivar su función. El Mn^{2+} es un potente inductor de la activación de las integrinas en un rango de concentración de micromolar. Fisiológicamente la concentración de Mn^{2+} es de 1-15 μM , llegando a 50 μM en ciertos microambiente como en el hueso (Hemler y col. 1990; Dransfield y col. 1992; Dransfield y col. 1992; Arroyo y col. 1993; Stuiver y O'Toole, 1995; Sánchez-Mateos y col. 1996).

Los residuos de las integrinas que unen los cationes divalentes y las secuencias en los ligandos (RGD), deben simultaneamente coordinarse con un único sitio de unión. De hecho datos recientes sugieren la formación de un complejo ternario entre integrina, ligando y cation, de tal manera que el tipo de catión unido, y el desplazamiento de los cationes del complejo ternario dictan el reconocimiento y la afinidad de la integrina por el ligando (Tuckwell y col. 1993; Stuiver y O'Toole, 1995).

b) Anticuerpos Monoclonales

Los AcMs que reconocen las distintas subunidades de las integrinas se pueden emplear simplemente como marcadores de la presencia de las integrinas, o interesantemente pueden afectar a la funcionalidad de las integrinas. Otro grupo de AcMs con una gran utilidad son los que reconocen estados concretos de activación de las integrinas, que pueden coincidir o no con el grupo de AcMs que reconocen epítomos en la integrina que aparecen después de haberse unido al ligando (*LIBS*: ligand induced binding sites).

Los AcMs inductores de la activación de las integrinas se unen a la subunidad correspondiente e inducen un cambio conformacional de la misma que representa un aumento en la afinidad

de la integrina por el ligando. Varios AcM anti- $\beta 3$: P41, Ab 62 y D3GP3; y AcM anti αIIb , inducen un aumento en la unión de fibrinógeno a $\alpha \text{IIb}\beta 3$ en reposo y estimula agregación plaquetaria (Stuiver y O'Toole, 1995). Diversos AcM anti- $\beta 1$ son capaces de inducir cambios conformacionales que lleve a un aumento en la afinidad de las integrinas VLA por sus ligandos: 8A2 (Kovach y col. 1992), TS2/16 (Arroyo y col. 1993). El AcM anti- $\beta 2$ NKI-L16, reconoce un epítipo dependiente de Ca^{2+} e induce adhesión mediada por $\alpha \text{L}\beta 2$ (van Kooyk y col. 1991).

Los AcMs que reconocen estados funcionales de las integrinas son muy útiles a la hora de identificar el estado de activación en el que se encuentran las integrinas e identificar que estímulos y bajo que condiciones se producen los cambios en la afinidad por los ligandos. Hasta el momento se han descrito AcMs de este tipo solo para las integrinas $\beta 2$ y $\beta 3$, siendo uno de los objetivos de esta tesis obtener AcMs de estas características para las integrinas $\beta 1$. El AcM PAC1 reconoce estados activados de la integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$ (Shattil y col. 1985). El AcM 24 reconoce un epítipo común en las tres subunidades α de las integrinas leucocitarias cuando se encuentran en un estado de alta afinidad (Dransfield y Hogg, 1989).

Los AcMs anti-LIBS reconocen epítopos en la integrina después de haberse unido a su ligando y tienen la propiedad de estabilizar la conformación de alta afinidad y mantener la unión al ligando. Por ejemplo el AcM 24 en integrinas $\beta 2$ (Cabañas y Hogg, 1993).

c) Activación con ligandos propios y péptidos miméticos

La unión de los ligandos o sus péptidos miméticos a las integrinas pueden alterar su conformación induciendo un estado de alta afinidad por el ligando. Se ha propuesto que las integrinas están en equilibrio entre múltiples estados conformacionales que son bioquímica e inmunológicamente distintos. Estos incluyen desde el estado en reposo (*resting*), que puede unir ligando inmovilizado,

pero no soluble, hasta la conformación activa que puede unir ligando soluble. Según esto, se ha propuesto que los ligandos y péptidos miméticos se unen con baja afinidad a las conformaciones en reposo y esto hace que cambie el equilibrio a favor de una conformación activa de la integrina, llevando a una situación ligando-integrina más estable. Se han hecho numerosos experimentos con el péptido RGD, que es la secuencia que reconocen algunas de las integrinas en sus respectivos ligandos (Stuiver y O'Toole, 1995; Sánchez-Mateos y col. 1996).

d) Activación por proteólisis.

Se ha visto como el tratamiento de plaquetas o membranas plaquetarias con quimiotripsina induce un aumento en la afinidad de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ por su ligando fibrinógeno. El mecanismo por el cual esta sucediendo no está muy claro, pudiendo ser: por un lado afectar al estado conformacional de la integrina, o por otro la eliminación de secuencias reguladoras negativas (Stuiver y O'Toole, 1995).

2) MODULACIÓN DE LA AFINIDAD DE LAS INTEGRINAS A TRAVÉS DE SEÑALES INTRACELULARES (*inside-out*).

Los dominios citoplásmicos de las subunidades α y β de las integrinas no tienen actividades enzimáticas intrínsecas, pero parecen funcionar como núcleo centralizador de grandes complejos de proteínas conteniendo elementos del citoesqueleto y proteínas enzimáticas señalizadoras que va a ser fundamental en los procesos de señalización mediada por integrinas tanto del tipo *outside-in* como *inside-out* (Clark y Brugge, 1995).

Los agonistas solubles que son capaces de activar integrinas no lo hacen directamente, sino que lo hacen uniéndose a sus receptores celulares seguido de los clásicos sistemas de señalización intracelular. Los dominios citoplásmicos de las integrinas son accesibles para estos eventos y parece ser que son

los responsables de la señalización *inside-out* y de los posteriores cambios conformacionales de las integrinas. Generalmente las proteínas G y las tirosinas kinasas son las que traducen esas señales que resultan en la activación de fosfolipasa C (PLC), cambios en el calcio citosólico y activación de proteínas kinasas celulares (Stuiver y O'Toole, 1995; Schwartz y col. 1995).

En el dominio citoplásmico de la subunidad β de las integrinas hay un conjunto de dos o tres residuos hidroxilados altamente conservados que han sido implicados en la regulación de la adhesión y afinidad por el ligando. En la posición más N-terminal del extremo citoplásmico de la subunidad α , se encuentra el motivo conservado GFFKR implicado en el mantenimiento de la integrina en estado de baja afinidad (Stuiver y O'Toole, 1995).

El "Modelo de la Activación Fisiológica" de las integrinas a partir de sus elementos citoplásmicos contempla: la activación fisiológica de las integrinas es específica del tipo celular, dependiente de energía y requiere secuencias citoplásmicas de ambas subunidades. Los elementos intracelulares que se van a unir a los extremos citoplásmicos de las integrinas van a determinar el estado de activación de las integrinas. Estos elementos forman el complejo activador de las integrinas (C.A.I.) y pueden estar formado por calreticulina, talina, α -actinina y la kinasa FAK. Esta interacción provoca cambios en la conformación de los extremos citoplásmicos de las integrinas, lo cual provocará un cambio conformacional en la región extracelular de la integrina que permitirá la unión de la integrina al ligando. Alternativamente los complejos reguladores podrían incrementar la adhesión celular a través del reagrupamiento o multimerización de las integrinas (Stuiver y O'Toole, 1995; Schwartz y col. 1995).

Entre las señales celulares que inducen la modificación de la afinidad de las integrinas se encuentran:

- * Regulación por modificaciones covalentes (ésteres de forbol)
- * Regulación por lípidos

- * Regulación por citoquinas y quimoquinas
- * Calcio intracelular

a) Regulación por modificaciones covalentes (ésteres de forbol).

Muchos agentes modifican la afinidad de las integrinas fosforilando los residuos citoplásmicos de las integrinas. Estos residuos potencialmente fosforilables son: serinas (ser), treoninas (thr) y tirosinas (tyr). Estos activadores inducen señales intracelulares y metabolitos que indirectamente activan proteínas kinasas causantes de la fosforilación de dichos residuos. Experimentalmente, los ésteres de forbol tales como el PMA o PdBu, que son potentes activadores de la proteína kinasa C (PKC), se han utilizado en diferentes sistemas celulares como agentes inductores de la adhesión celular mediada por integrinas. Dos mecanismos pueden estar implicados en ese aumento de la adhesión celular mediada por integrinas a través de los ésteres de forbol: 1) inducción de los receptores a un estado de alta afinidad, probablemente por cambio conformacional de las moléculas (Lollo y col. 1993). 2) El aumento de adhesión puede venir dado también por eventos que ocurren después de la unión de la integrina al ligando, tal como la inducción del citoesqueleto a inducir "spreading" (aplastamiento) celular (Faul y col. 1994). Todo ello hace pensar que la fosforilación de los residuos en el extremo citoplásmico de las integrinas es crucial para obtener el estado de alta afinidad por el ligando. Experimentalmente se visto una correlación entre la actividad de PKC y la regulación positiva de la función de las integrinas (Stuiver y O'Toole, 1995).

En integrinas $\beta 1$ se ha visto que la adhesión celular a ligandos para integrinas de la matriz extracelular puede ser aumentada por activación con PKC. Estudios de mutagénesis han desvelado la implicación de dominios citoplásmicos de las subunidades α en la regulación de la función de adhesión de las integrinas en este sistema. Se ha demostrado como las formas

truncadas de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 4$ y $\alpha 6$ inhiben la adhesión estimulada por ésteres de forbol. Mientras que las formas truncadas de $\alpha 5$ y $\alpha 1$ no tenían ningún efecto. Deleciones en el extremo citoplásmico de la subunidad $\beta 1$ tenía efectos variables en la adhesión a fibronectina (Stuiver y O'Toole, 1995).

b) Regulación por lípidos

Hay casos en los que tanto la composición general de los lípidos como la alteración en la composición lipídica de la membrana celular, son capaces de regular o alterar la función de las integrinas. El factor de modulación de la integrina (IMF-1), es un lípido de nueva síntesis como resultado de la estimulación por agonistas en neutrófilos. IMF-1 incrementa la avidéz de $\alpha M\beta 2$ de los neutrófilos por los eritrocitos recubiertos por C3bi (Hermanowski y col. 1992; Stuiver y O'Toole, 1995).

c) Regulación por citoquinas y quimoquinas

Varias citoquinas y quimoquinas son capaces de regular el estado de activación de las integrinas. En procesos inflamatorios la activación de monocitos y neutrófilos por mediadores inflamatorios tales como TNF- α , C5a o fMet-Leu-Phe es necesaria para la adhesión mediada por integrinas $\beta 1$ y $\beta 2$ al endotelio y su posterior trans migración (Zimmerman y col. 1992).

d) Calcio intracelular

Recientemente se ha demostrado que un incremento en la concentración del calcio en el citosol celular, utilizando ionóforos de calcio tales como A23187 e Ionomicina, aumenta la activación de las integrinas (Hartfield y col. 1993).

SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR A TRAVÉS DE INTEGRINAS (*outside-in*).

La asociación de proteínas del citoesqueleto y elementos señalizadores con los extremos citoplásmicos de las integrinas es importante para la señalización bioquímica del tipo *outside-in*. Después de la unión de la integrina a su ligando, ésta sufre un cambio conformacional que favorece la interacción de proteínas del citoesqueleto con los dominios citoplásmicos de las integrinas. Todo ello determinará la reorganización del citoesqueleto junto con las integrinas. Se puede llegar a inducir el clustering de las integrinas e incluso *spreading* celular en sitios de contacto íntimo entre citoesqueleto y matriz extracelular, conocidos como contactos focales. Aquí se dan lugar, aparte de las proteínas estructurales talina, α -actinina, vinculina, paxilina y tensina, los eventos señalizadores como proteínas kinasas FAK y pp60src. También, se ha visto una proteína de 60 kDa homóloga a una proteína que une calcio, calreticulina, unida al dominio KXGFFKR de los extremos citoplásmicos de las subunidades α (Rosales y col. 1995; Stuver y O'Toole, 1995; Sánchez-Mateos y col. 1996).

Modelo estructural de los focos de adhesión

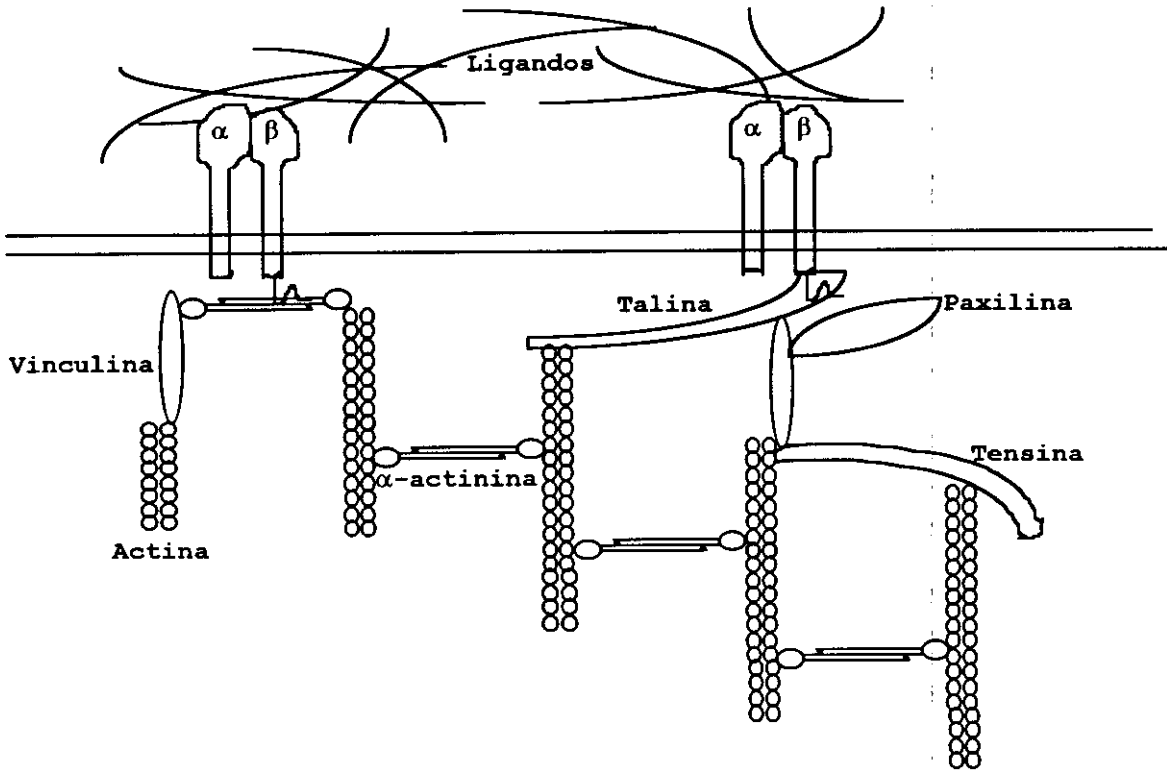


Figura 4. Elementos estructurales implicados en los focos de adhesión. La unión de las integrinas a sus ligandos induce la reorganización de los distintos componentes del citoesqueleto.

La fosforilación de proteínas es uno de los eventos más inmediatos detectados en respuesta a la estimulación de integrinas. La kinasa asociada a los focos de adhesión de 125 kDa FAK o pp125^{FAK} forma un complejo de kinasas que se colocan junto con el extremo citoplásmico de la subunidad β directa o indirectamente a través de interacciones con componentes del citoesqueleto como consecuencia de la adhesión celular mediada por integrinas o el *clustering* de las integrinas inducido por la unión al ligando (Clark y Brugge, 1995; Schwartz y col. 1995).

El incremento de fosforilación en tirosina está asociado en primer lugar con un incremento en la autofosforilación de FAK y posterior actividad hacia sustratos exógenos. Las proteínas del citoesqueleto paxilina y tensina se encuentran en los contactos

focales y son sustratos para FAK. La paxilina se une a vinculina y se fosforila en tirosina en células adherentes. La tensina también se fosforila en tirosina en células adherentes y es capaz de formar complejos de señalización con otras proteínas fosforiladas en tirosina por su dominio SH2 (Clark y Brugge, 1995).

La forma fosforilada de FAK se puede asociar a tirosinas kinasas de la familia src (Syk) por el dominio SH2. La asociación entre FAK y los miembros de la familia src incrementan la fosforilación de FAK lo que puede crear sitios de unión con el dominio SH2 para otras proteínas (Rosales y col. 1995; Schwartz y col. 1995).

Hay proteínas tirosinas fosfatasas que participan en la señalización de las integrinas. Hasta ahora se han descrito dos: CD45 en linfocitos y PTP1B en plaquetas (Clark y Brugge, 1995).

Hay proteínas adaptadoras que están compuestas exclusivamente de dominios SH2 y SH3, que han sido implicadas en la interacción proteína-proteína en la cascada de señalización intracelular mediada por integrinas. Una de estas proteínas es Grb2 (proteína que une el receptor del factor de crecimiento), que une FAK a un activador de Ras mSOS1, factor de intercambio de guanina, convirtiendo el inactivo Ras-GDP a activo Ras-GTP. Crk es otra proteína adaptadora, asociada con la forma fosforilada de la paxilina, que puede activar Ras a través de la proteína de intercambio de guanina C3G. Grb-2 y Crk podría relacionar a las integrinas y el citoesqueleto con la señalización de Ras a través de interacciones con FAK-mSOS1 y paxilina-C3G. Recientemente se ha visto como formas activas de Ras recombinante inducen aumento en la actividad de las integrinas $\beta 1$ (Clark y Brugge 1995; Zhang y col. 1996).

Complejo de señalización asociado a las integrinas

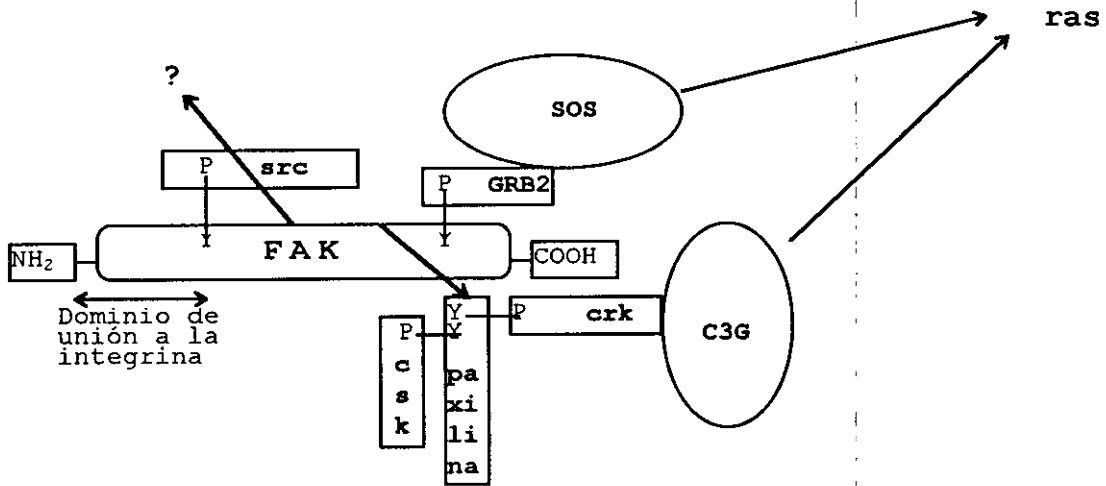


Figura 5. FAK o pp125^{FAK} está ampliamente expresada en todos los tipos celulares y tejidos. Estructuralmente presenta el dominio central catalítico flanqueado por los dominios largos N-terminal y C-terminal. Es una proteína citosólica. Carece de dominios SH2 y SH3. En células en cultivo se localizan en contactos focales. La región C-terminal de 150 amino-ácidos, conocida como FAT (diana de los focos de adhesión), y es la región necesaria y suficiente para su localización en los contactos focales. FAK se une a residuos próximos a la membrana del dominio citoplásmico de la subunidad β de las integrinas a través de su dominio N-terminal no-catalítico. Las proteínas asociadas a contactos focales paxilina (70 kDa) y talina interaccionan con el extremo C-terminal de FAK (Schwartz y col. 1995).

Ras-GTP va a actuar activando MAP (proteína activada por mitógenos) kinasas, proceso en el que se requiere la integridad del citoesqueleto de actina. La activación de MAP kinasa por un lado puede fosforilar y activar factores de transcripción, lo cual relaciona directamente la activación de las integrinas con la regulación de algunos genes. Por otro lado MAP kinasa puede fosforilar y activar la fosfolipasa A_2 citoplásmica (cPLA₂), la cual hidroliza glicerofosfolípidos para dar lugar a ácido araquidónico y lisofosfolípidos. El ácido araquidónico induce la producción de leucotrienos a través de la enzima 5-lipoxigenasa, esencial para la polimerización de actina y el *spreading* celular. Implicación directa del camino MAP kinasa y cPLA₂ en la reorganización del citoesqueleto necesario para el *spreading* celular (Clark y Brugge 1995).

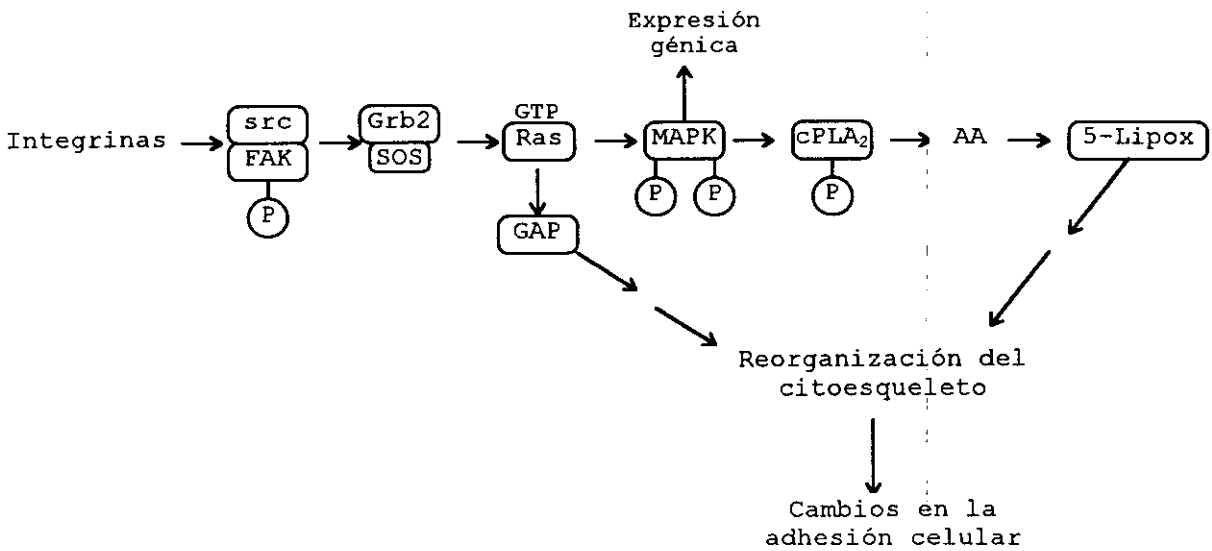


Figura 6. Cascada de señalización bioquímica intracelular mediada por integrinas.

Otras enzimas del tipo de kinasas de fosfolípidos (PI-3K y PI-5K) y la kinasa de la proteína C (PKC), están implicadas en la regulación de la reorganización del citoesqueleto por la activación de integrinas (Clark y Brugge 1995; Schwartz y col. 1995).

Las integrinas también pueden activar la fosfolipasa C (PLC) hidrolizando PIP_2 a sus segundos mensajeros diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). El IP_3 va a inducir un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. El DAG junto con el Ca^{2+} liberado en el citosol van a activar las diferentes formas de PKC lo cual conducirá a una reorganización del citoesqueleto aumentando la formación de focos de adhesión resultando en un aumento del *spreading* celular y la fosforilación en tirosina de FAK. PKC regula la interacción de actina a la membrana celular a través de la fosforilación de una fosfoproteína MARCKS, que se localiza en sitios similares a los focos de adhesión (Clark y Brugge 1995; Schwartz y col. 1995).

Conclusión: diferentes integrinas utilizan diferentes caminos de señalización bioquímica, conferiéndole su gran especificidad (Rosales y col. 1995).

COORDINACION DE LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.

La señalización intracelular de las integrinas no funciona aisladamente, sino que se debe coordinar con las que parten de otros receptores. Múltiples sistemas de receptores pueden cooperar con las integrinas para regular la funcionalidad celular: proliferación, movilidad y secreción celular (Miyamoto y col. 1993; Clark y Brugge, 1995).

Una de las proteínas que integran las señales inducidas por las integrinas y los factores de crecimiento es la proteína de pequeño peso molecular trifosfatasa guanosina (GTPasa) Rho. Rho induce activación de tirosinas kinasas (Fak y paxilina), que se requiere para la formación de contactos focales y fibras de estrés, implicando posiblemente PI-3K y PIP-5K. La proteína activadora GTP-asa de Ras (Ras-GAP) es clave en los cambios de la forma y adhesión celular mediada por factores de crecimiento (Clark y Brugge 1995; Schwartz y col. 1995).

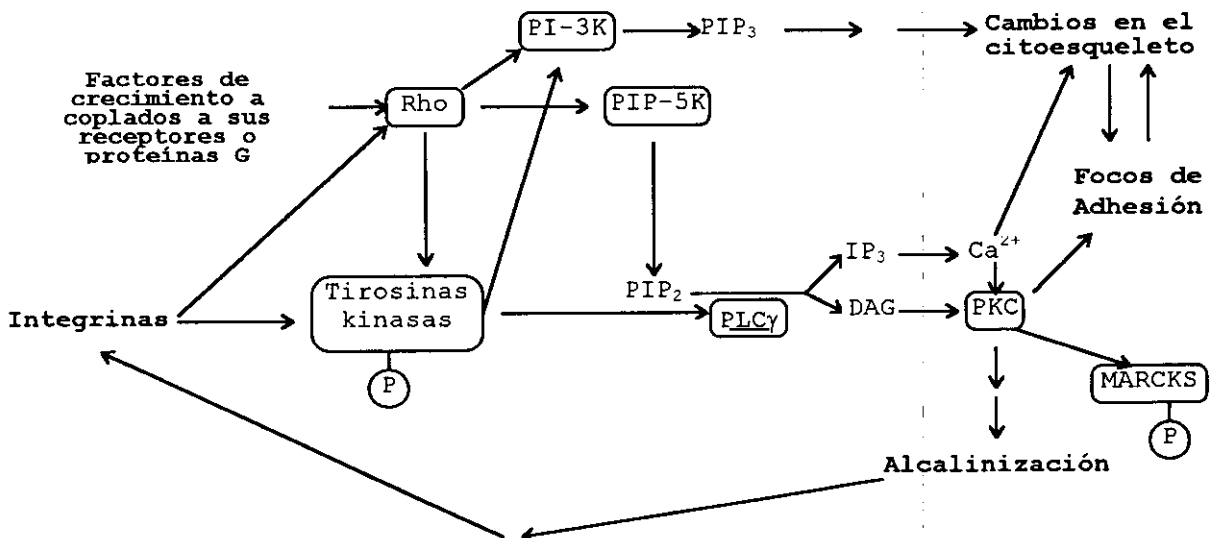


Figura 7. Procesos enzimáticos que cooperan en la coordinación de la señalización de las integrinas junto con las de otros receptores.

INDUCCIÓN DE GENES MEDIADO POR INTEGRINAS

Las integrinas regulan la expresión de genes en varios tipos celulares a través de la activación de tirosinas kinasas y por la ruta de la MAP kinasa.

Hay muchos ejemplos que indican que la interacción celular con componentes de la matriz extracelular a través de las integrinas puede afectar a la diferenciación celular y expresión génica. La unión de fibroblastos a un sustrato incrementa rápidamente la expresión del mensajero de c-fos y posteriormente induce el mensajero del colágeno pro- α -1 (Dhawan y col. 1991). La interacción de α 5 β 1 con su anticuerpo o la adhesión a fibronectina inducen la expresión de los genes de metaloproteasas en células fibroblásticas (Werb y col. 1989).

En el caso de adhesión de líneas monocíticas a sustratos de integrinas β 1, como fibronectina laminina o colágeno, hay una rápida inducción de genes tempranos incluyendo factores de transcripción tales como c-fos, C-jun, I κ B y MAD-6/A20 y citoquinas IL-1 β , IL-8 y TNF α . Muchos de estos genes inducidos por la unión de las integrinas a su ligando están regulados por el factor de transcripción NF- κ B. En estos procesos se ha visto la implicación de fosforilaciones en tirosina, siendo la responsable la tirosina kinasa Syk (Yurochko y col. 1992; Juliano y Haskill, 1993; Rosales y col. 1995).

EL PAPEL DE LAS INTEGRINAS EN PROCESOS BIOLÓGICOS.

Prácticamente, en la totalidad de los procesos biológicos se dan situaciones de adhesión celular ya sean entre células o entre células y componentes de la matriz extracelular. De tal manera que si estas interacciones se encuentran alteradas por alguna circunstancias puede dar lugar a patologías graves. La familia de

las integrinas es una de las familias de moléculas de adhesión más importantes en este sentido. A continuación veremos algunos de los procesos fisiológicos en los que intervienen las integrinas y algunas de las enfermedades causadas por la descompensación funcional de las integrinas.

1. Desarrollo embrionario.

Una de las características de la embriogénesis es la regulación del movimiento de los grupos de células morfogénicas, comenzando en la gastrulación y continuando a lo largo del desarrollo. Para estos movimientos, las moléculas de la superficie celular deben reconocer y responder a moléculas de la matriz extracelular y de la superficie de otras células. Los niveles de las integrinas se modulan durante el desarrollo, siendo relativamente altos durante los periodos de histogénesis y se reducen cuando se ha alcanzado la fase final de diferenciación (Albelda y Buck, 1990).

Anticuerpos contra la subunidad $\beta 1$ aplicados en el proceso de migración en las células de la cresta neural o mioblastos, causa alteraciones en la formación de la musculatura abdominal. De la misma manera, péptidos RGD inyectados en embriones de anfibios o insectos interfiere con la gastrulación, presumiblemente por la interrupción de la interacción de las integrinas con sus ligandos (Albelda y Buck, 1990).

2. Integrinas en inflamación, curación de heridas y trombosis.

La generación de la respuesta inmune y la vigilancia del organismo contra aquello reconocido como extraño, requiere la migración de las células inmunes a los sitios de la estimulación antigénica. Estos procesos dependen de la comunicación entre las células residentes del tejido dañado y las células efectoras circulantes. Esta comunicación se lleva a cabo a través de factores mediadores (citoquinas) y el contacto celular mediante moléculas de

adhesión específicas , principalmente las integrinas (Albelda y Buck, 1990; Postigo y Sánchez-Madrid, 1993).

2.1. In inflamación

La respuesta inflamatoria a antígenos extraños o a bacterias comienza con la atracción de macrófagos, que liberan mediadores biológicamente activos tales como interleuquina-1 (IL-1), factor de la necrosis tumoral (TNF) y el factor de crecimiento transformado- β (TGF- β). En infecciones bacterianas también están presentes endotoxinas y otros quimioatrayentes. Estos factores estimulan la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales: ICAM-1, ELAM-1, GMP-140 y VCAM-1; y la expresión de integrinas leucocitarias y ICAM-1 en los linfocitos vasculares proximos al foco infeccioso. Los linfocitos se adhieren a las paredes del vaso activado, migran a través del endotelio llegando a las areas de infección o del tejido dañado. En una respuesta inflamatoria inmune, los linfocitos T interaccionan con los macrófagos portadores del antígeno. Aunque la especificidad de este reconocimiento es debido al receptor de células T (TCR), esta interacción genera señales intracelulares que potencia la unión LFA-1-ICAM-1. Esto estabiliza el contacto célula-célula e incrementa la sensibilidad de las células T (Albelda y Buck, 1990; Springer. 1990).

2.2. Coagulación y curación de heridas.

El daño de un tejido va a ocasionar la unión de plaquetas a la matriz expuesta via integrinas $\beta 3$ y $\beta 1$, incluyendo $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 6\beta 1$. La activación de la coagulación sanguínea tambien genera trombina que va a activar la integrina plaquetaria gpIIb/IIIa, y va a promover una mayor agregación plaquetaria y liberación de gránulos. Se forma una matriz provisional conteniendo plaquetas, fibrinógeno, fibrina y fibronectina. En este momento tiene lugar una reacción inflamatoria debido a la secreción de los gránulos plaquetarios (por ej.: TGF- β), trombina y los propios factores del tejido dañado, ocurriendo una activación de células endoteliales y leucocitos, que va a resultar en la extravasación de los mismos.

Las citoquinas liberadas por los linfocitos y plaquetas van a estimular la activación de las integrinas de los macrófagos y fibroblastos induciendo la migración hacia el sitio dañado, donde desarrollarán su función (Albelda y Buck, 1990).

3. Invasión tumoral y metástasis

El proceso de crecimiento tumoral y su posterior metástasis incluyen una serie de etapas: 1) crecimiento del tumor y salida de las células tumorales del tumor primario. 2) Movimiento de las células hacia los vasos linfáticos o sanguíneos. 3) Las células tumorales deben sobrevivir dentro de la circulación a la intreracción con las plaquetas y el sistema de coagulación. 4) Las células tumorales interaccionarán con el endotelio en un sitio determinado. 5) Migración de las células cancerígenas a un tejido donde se desarrollará el crecimiento del tumor secundario. Los procesos de invasión tumoral y metástasis requieren cambios complejos en las interacciones normales entre las células o entre células y matriz extracelular. Entre otras moléculas de adhesión como cadherinas, inmunoglobulinas y CD 44, las integrinas juegan un papel muy importante en todos estos procesos.

Todos los datos de los que se dispone relacionando la expresión de las integrinas con el crecimiento y metástasis del tumor sugieren las siguientes generalizaciones: a) en los estadios más tempranos del crecimiento del tumor, la disminución de la adhesión a la membrana basal o a proteínas de la matriz extracelular es ventajoso, como ocurre en 1) la pérdida de expresión del receptor de fibronectina $\alpha 5 \beta 1$ en fibroblastos transformados. 2) En tumores epiteliales disminuye la expresión de los receptores de colágeno y laminina. 3) En células de ovario de hamster chino se ha relacionado el aumento del crecimiento del tumor con la disminución de $\alpha 5 \beta 1$. Por otro lado en melanomas el incremento de la expresión del receptor de vitronectina $\alpha v \beta 3$ esta relacionada con el aumento de la capacidad invasiva (Albelda, 1993).

b) El aumento de la expresión de las integrinas en las células tumorales después de haber alcanzado la circulación debe de ayudar a la implantación y favorecer la metástasis. a) La metástasis se inhibe con péptidos RGD y disintegrinas. b) alta capacidad metastática de células de rabdomiosarcoma trasfectada con VLA-2 (Albelda y Buck, 1990; Albelda 1993; Giancotti y Mainiero, 1994).

4. Integrinas y rechazo de trasplantes

Las integrinas intervienen en procesos de transplantes y rechazo de injertos. En implantes alogénicos, el tratamiento con ACM frente a moléculas de adhesión incrementan la tolerancia del injerto. ACM contra ICAM-1 o LFA-1 disminuye el rechazo de injertos renales y cardíacos en modelos animales (Postigo y Sánchez-Madrid, 1993).

5. Integrinas como receptores de patógenos.

Varios de los miembros de la superfamilia de las integrinas actúan como receptores de membrana y posterior internalización o infección celular para diversos agentes patógenos, tanto de caracter bacteriano como vírico (Isberg y Leong, 1990; Bergelson y col. 1992).

ENFERMEDADES CAUSADAS POR DEFICIENCIAS EN INTEGRINAS.

LAD (deficiencia de la adhesión leucocitaria) son las iniciales de una enfermedad hereditaria que se caracteriza por deficiencias en la funcionalidad de la subunidad $\beta 2$ de esta subfamilia de integrinas. Los pacientes presentan infecciones bacterianas recurrentes, retraso en la separación del cordón umbilical y función anormal de los leucocitos. Celularmente, los neutrófilos son incapaces de unirse al endotelio y tienen grandes dificultades en la agregación celular, citotoxicidad dependiente de anticuerpo y fagocitosis, resultando en incapacidad de combatir la

infección. La funcionalidad de las células T también está afectada, aunque su migración no (Albelda y Buck, 1990).

La **trombastemia de Glanzman** es una enfermedad causada por la deficiencia de la integrina gpIIb/IIIa, se caracteriza, por un desorden sanguíneo debido a un fallo en la agregación plaquetaria posterior a la estimulación con agonistas (Albelda y Buck, 1990).

La **artritis reumatoide** es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la infiltración, a través de la membrana sinovial, de células T al fluido sinovial. Estos linfocitos T se encuentran en un estado de memoria (CD45RO) y activados: disponen de una alta capacidad de adhesión debido a un aumento en la función de las integrinas (VLA-4, VLA-5 y LFA-1), permitiéndole interaccionar con el endotelio activado y migrar hacia el tejido inflamado (Postigo y Sánchez-Madrid, 1993).

POSIBLES TERAPIAS

Un mayor conocimiento de las características y necesidades funcionales de las moléculas de adhesión en general y de las integrinas en particular es imprescindible para diseñar nuevas estrategias terapéuticas para combatir esas enfermedades. Se han empezado a utilizar AcMs frente a integrinas, así como péptidos RGD para el tratamiento de algunas enfermedades (Albelda y Buck, 1990).

2. OBJETIVOS

Las integrinas constituyen una familia de moléculas de adhesión que participan, mediando adhesión entre células o entre células y diferentes componentes de la matriz extracelular, en numerosos y complejos procesos biológicos, que incluyen migración celular, organización tisular, crecimiento celular, coagulación sanguínea, inflamación, dianas de reconocimiento para linfocitos T y diferenciación de muchos tipos celulares. Se ha observado que la desfuncionalidad de las integrinas ocasionan procesos patológicos en algunos de estos fenómenos biológicos.

Las integrinas se pueden encontrar sobre la superficie celular en diferentes estados de activación, desempeñando su función de interacción con sus respectivos ligandos únicamente en los casos que presentan estados activados o, al menos, parcialmente activados. Estímulos tanto extracelulares como intracelulares van a tener la capacidad de alterar la activación de las integrinas. Es de vital importancia profundizar sobre los mecanismos por los cuales se inducen cambios en la activación de las integrinas así como los estímulos que los inducen. Por todo esto los objetivos que nos planteamos para el desarrollo de esta Tesis Doctoral son:

- 1) En primer lugar la purificación de integrinas $\beta 1$ en estado activado.
- 2) Caracterización funcional del heterodímero VLA-1 mediante AcMs específicos.
- 3) Obtención, selección y caracterización de AcMs reportadores del estado de activación de las integrinas $\beta 1$.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

1) Células y Cultivos celulares.

Las líneas celulares con las que se han realizado este trabajo las resumo en la tabla 1. Todas las líneas crecen en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowhittaker, Fontenay Sous Bois, Francia), 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin (ICN Biomedicals, Costa Mesa, CA). Los cultivos celulares se mantienen en un incubador de células a 37°C, 95% de humedad relativa y una atmósfera con 5% de CO₂.

En este trabajo también se ensayaron linfocitos aislados de sangre periférica, así como linfocitos T cultivados. Los linfocitos T humanos se purifican a partir de sangre extraída a pacientes normales por centrifugación en gradiente de densidad a través de una solución aisladora de linfocitos (RAFER, Zareagoza). Las células mononucleares purificadas se ponen en cultivo, en el mismo medio anteriormente comentado, en presencia de 0.5% de fitohemoaglutinina (PHA, Pharmacia) durante 48 horas. Después de lo cual se lavan las células y se mantienen en cultivo en presencia de 50 U/ml de IL-2 (Nos la proporcionó la Dr. N. Hogg). Los experimentos se realizaron con linfoblastos T de entre 7-12 días en cultivo.

Línea celular	Origen
NB 100	Neuroblastoma
DX3	Melanoma
Colo 320	Colocarcinoma
U-937	Mielomonocítica
K562	Eritroleucémica
Ramos	Linfoblastoide B
JY	Linfoblastoide B

Tabla 1. Resumen de las líneas celulares utilizadas en esta Tesis Doctoral.

2) Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (AcM/AcMs) utilizados en esta Tesis Doctoral se resumen en la tabla 2.

AcM	Especificidad	Característica	Origen	Referencia
TS 2/16	anti- β 1 (CD29)	Activador	Dr. Sánchez-Madrid	Hemler y col. 1984
Lia 1/2	anti- β 1 (CD29)	Inhibidor	Dr. Sánchez-Madrid	Campanero y col. 1992
HUTS	anti- β 1 (CD29)	estados activados		
TS 2/7	anti- α 1 (CD49a)	Reconocimiento	Dr. Sánchez-Madrid	Hemler y col. 1984
5E8D9	anti- α 1 (CD49a)	Inhibidor		
12F1	anti- α 2 (CD49b)	Inhibidor	Dr. Sánchez-Madrid	Pischel y col. 1987
Tea 1/41	anti- α 2 (CD49b)	Reconocimiento	Dr. Sánchez-Madrid	Luque y col. 1994
PIB5	anti- α 3 (CD49c)	Reconocimiento	Dr. Hogg	Wayner y col. 1987
HP 2/1	anti- α 4 (CD49d)	Reconocimiento	Dr. Sánchez-Madrid	Campanero y col. 1994
GoH3	anti- α 6 (CD49f)	Reconocimiento	Dr. Sánchez-Madrid	Sonnenberg y col. 1988
Lia 3/2	anti- β 2 (CD18)	Reconocimiento	Dr. Sánchez-Madrid	Campanero y col. 1993
TP 1/40	CD11a	Reconocimiento	Dr. Sánchez-Madrid	Campanero y col. 1993
HC 1/1	anti- CD11c	Reconocimiento	Dr. Cabañas	Cabañas y col. 1988
D3/9	CD45	Reconocimiento	Dr. Sánchez-Madrid	Pulido y col. 1988
P3X63		Control negativo	Dr. Sánchez-Madrid	Campanero y col. 1992

Tabla 2. Resumen de los anticuerpos monoclonales, sus características y origen, utilizados en esta Tesis Doctoral.

3) Proteínas de la matriz extracelular.

Las proteínas de matriz extracelular que se utilizaron en esta tesis son : fibronectina, colágeno y laminina.

3.1) Fibronectina. La fibronectina (Sigma, San luis, MO). es una proteína que se encuentra formando parte tanto de la matriz extracelular como soluble en el plasma. El peso molecular de la

fibronectina es aproximadamente de 440 kDa y está compuesta por la asociación de dos cadenas polipeptídicas A y B a través de dos puentes disulfuro próximo al extremo C-terminal. La estructura de la fibronectina varía como consecuencia del "splicing" alternativo. Como regla general, la secuencia polipeptídica consta de repeticiones de secuencias de tres tipos: tipo I, II y III. El tipo I son dominios de 45 aminoácidos y forma el extremo N- y C-terminal. Dos secuencias de 60 aminoácidos, tipo II, se intercalan entre las nueve secuencias repetidas en el extremo N-terminal. Finalmente hay 15-17 segmentos del tipo III, de aproximadamente 90 aminoácidos, ocupando la mitad de la molécula (Ruoslahti, 1988).

La fibronectina dispone de varios sitios de unión para diferentes proteínas, así como para receptores celulares. Desde el extremo N-terminal al C-terminal, los sitios de unión son: para fibrina y heparina en el sitio I, gelatina y colágeno en el sitio II, sitio de unión para las células y heparina en el sitio III, y finalmente, unión a fibrina en el sitio II. También puede unir ADN, IgG, C3, etc. (fig. 1) (Hynes, 1990; Ruoslahti, 1988).

Todos estos potenciales sitios de unión, le confiere a la fibronectina una serie de funciones regulando la adhesión celular y migración celular en el campo de la diferenciación y crecimiento celular, trombosis, fagocitosis y curación de heridas (Ruoslahti, 1988).

Los receptores celulares de la fibronectina están constituidos por miembros de las integrinas de la subfamilia VLA. Los sitios activos de la fibronectina para la unión celular se encuentran en ambas cadenas en la región central y corresponde a una región con el tripéptido RGD que media adhesión a VLA-4 y VLA-5. En la cadena A de la fibronectina y próximo al extremo C-terminal está la región IIIICS, con las regiones CS-1 y CS-5 que son sitios de unión para VLA-4; al igual que las secuencias H1, I y II pertenecientes al dominio Hep II (fig. 1).

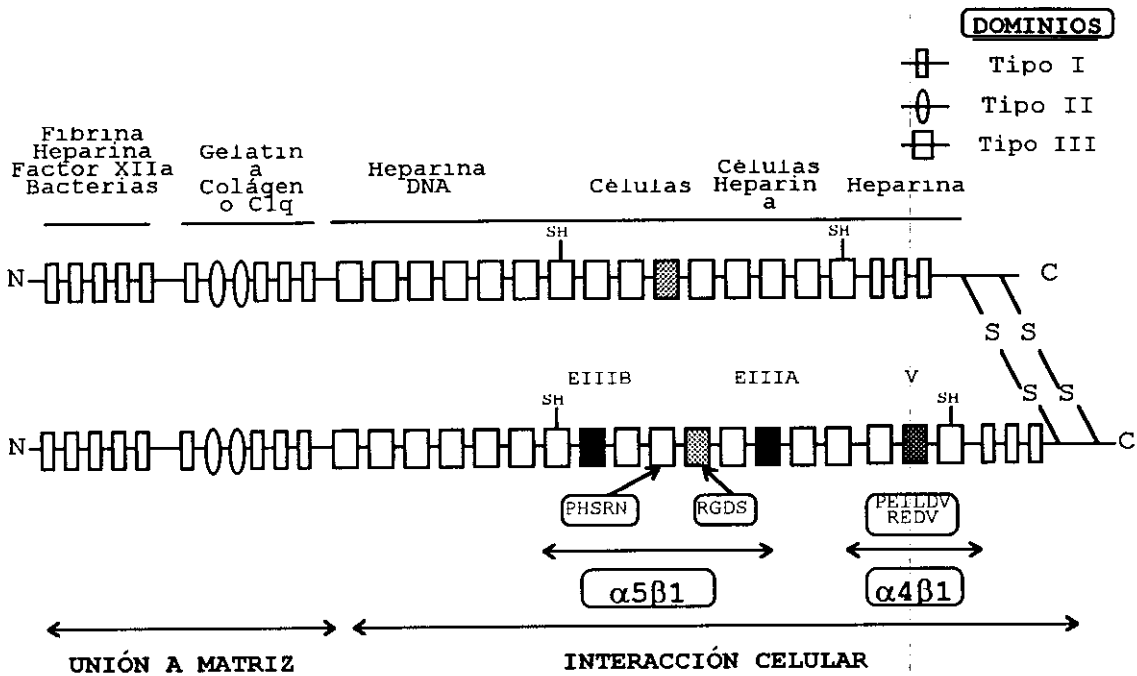


Figura 1. Estructura modular de la fibronectina. En la figura se muestra una molécula de fibronectina formada por dos cadenas polipeptídicas unidas por puentes disulfuro en sus extremos C-terminal. Las dos cadenas están formadas por repeticiones de diferentes dominios (Tipo I, II y III), en la figura aparecen una de ellas con todos los módulos incluidos los que pueden sufrir procesamiento alternativo (EIIIA, EIIIB y V) y la otra carente de ellos. En la figura también se muestran las regiones de unión para los distintos componentes de la matriz así como para los receptores celulares.

3.2) Laminina. La laminina fue donada por la Dr. M. A. Lizarbe. La laminina es una glicoproteína (fig. 2) localizada específicamente en las membranas basales y es un potente regulador de las células epiteliales. La laminina ejerce diferentes actividades biológicas regulando la adhesión, migración, crecimiento y diferenciación de varios tipos celulares (Sasaki y col. 1988).

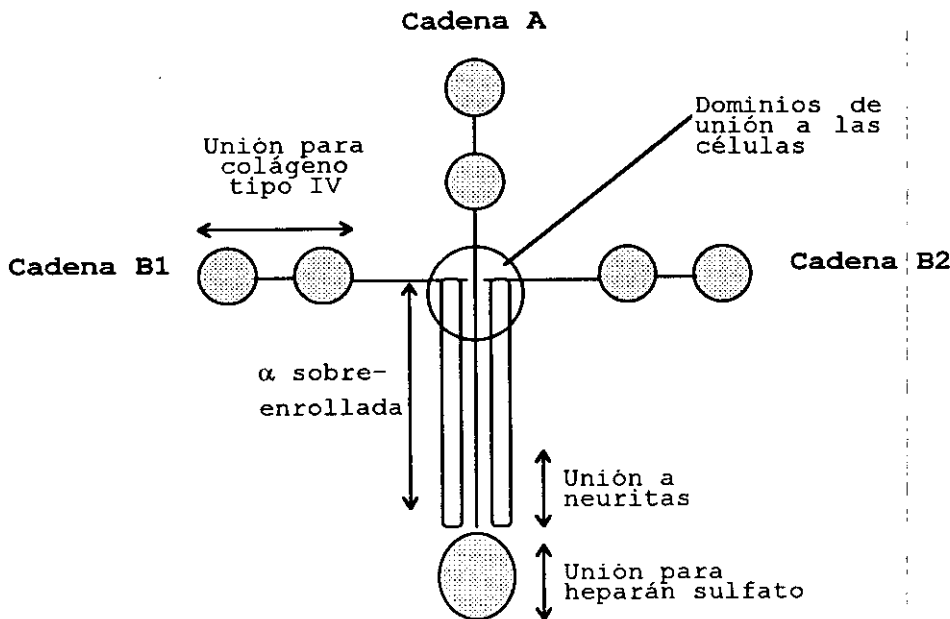


Figura 2. Estructuralmente la laminina está compuesta por tres cadenas polipeptídicas, B1 (220 kDa), B2 (210 kDa) y B3 (400 kDa), unidas por puentes disulfuro formando una estructura en cruz, con un brazo largo y tres brazos cortos con terminaciones globulares. A esta molécula se le pueden unir diferentes moléculas pertenecientes a la matriz extracelular. Los receptores celulares de la laminina son por un lado un receptor de 67 kDa, y por otro un miembro de la subfamilia de las integrinas $\beta 1$, VLA-6 (Sasaki y col. 1988; Hynes, 1992).

3.3) Colágeno. La superfamilia de los colágenos está compuesta por al menos 19 proteínas definidas como colágenos y otras 10 que tienen dominios homólogos al colágeno. Los colágenos más abundantes están formando parte de la matriz extracelular organizándose en fibrillas (tipos I, II, III, V y XI) o redes tridimensionales más complejas (Tipo IV, VIII y X). La unidad estructural del colágeno es la fibrilla, que consiste en una triple hélice formada por tres cadenas polipeptídicas (Prockop y Kivirikko, 1995).

Los receptores celulares para colágeno son miembros de las integrinas $\beta 1$: VLA-1, VLA-2 y VLA-3 (Hynes, 1992).

Los ensayos de adhesión se realizaron con colágeno de tipo I

(vitrogen 100), adquirido en ICN Biomedicals.

4) Acoplamiento del AcM TS2/16 a sefarosa CL4B activada con CNBr.

El AcM TS2/16 purificado a una concentración de 2 mg/ml se dializa durante 18-24 h/4°C en el tampón de acoplamiento (0.1 M CO_3HNa , 0.5 M NaCl, pH 8.3). La sefarosa CL4B activada con CNBr (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) se hincha, en el momento de ser utilizada, en un vaso de precipitado durante 15 min con 15 ml de HCl 1 mM y luego se lava con 200 ml de HCl 1 mM por cada gramo de sefarosa. Por último se lava con tampón de acoplamiento y se pasa rápidamente a un tubo que contenga el AcM dializado en una proporción 1 vol de sefarosa: 2 vol de la solución conteniendo el AcM. Se incuba toda la noche agitando/4°C. Al día siguiente se centrifuga 2 min/600 rpm y se recoge el sobrenadante. La sefarosa se incuba en agitación con 0.1 M glicina pH 8 (100 μl /ml de sefarosa) durante 20 min/4°C para bloquear los grupos activos residuales de la sefarosa. Se centrifuga y se lava la sefarosa dos veces con el tampón de acoplamiento. Posteriormente se incuba la sefarosa con 0.1 M $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}$, 0.5 M NaCl, pH 4, durante 10 min a 4°C, para liberar el exceso de AcM no acoplado. Finalmente se lava dos veces con PBS y se resuspende en un volumen igual al de la sefarosa con azida sódica al 0.02%. En todos los lavados anteriores se recoge el sobrenadante para medir la absorbancia a 280 nm y calcular el porcentaje de acoplamiento del AcM a la sefarosa, comparándola con la concentración del AcM al principio del proceso.

En un proceso similar al descrito anteriormente, se acopló glicina a 3 ml de sefarosa CL4B activada con CNBr para montar una columna, previa a la columna del AcM TS2/16-Sefarosa, que preaclara el lisado de los tejidos.

5) Purificación de integrinas $\beta 1$ activadas por cromatografía de inmunoafinidad.

Las integrinas $\beta 1$ se purificaron en estado activado a partir de lisados de tejidos humanos por cromatografía de inmuoafinidad utilizando el AcM activador anti- $\beta 1$ TS2/16 y en presencia de los cationes divalentes activadores de las integrinas Mg^{2+} y Mn^{2+} .

Los tejidos humanos a partir de los cuales se purificaron las integrinas $\beta 1$ son: bazo y una mezcla de pulmón, hígado y músculo esquelético, todos ellos obtenidos en el Departamento de Patología del Hospital de la Princesa, Madrid. Estos tejidos fueron troceados, tamizados y lisados en el tampón de lisis (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $MnCl_2$, 1% TX100, 0.02% NaN_3 , 1 mM PMSF, 0.2 U/ml de aprotinina, 5 mM iodoacetamida, pH 8) en una relación de 3 ml de tampón de lisis por 1 g de tejido. La lisis se mantenía a 4°C durante 2 h y en continua agitación. El lisado de los tejidos se centrifugaba a 3.000 x g durante 30 min a 4°C y posteriormente se ultracentrifugaba 1 h/4°C a 100.000 x g. Los lisados se pueden conservar congelados a -70°C.

A continuación se procedía a la purificación de las integrinas $\beta 1$. Todo el proceso de purificación se realizó a 4°C. La sefarosa acoplada a sus respectivas proteínas se montaban en columnas de tal manera que primero el lisado pasa y se preaclara por la columna de glicina-sefarosa, y luego llega a la columna del AcM-sefarosa donde se quedarán específicamente unidas las integrinas $\beta 1$ al AcM TS2/16. Las columnas se equilibran con tampón de lisis y se carga el lisado a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. Una vez pasado el lisado, se separan las columnas y a partir de ahora se trabaja solo con la columna de TS2/16-sefarosa para eluir las integrinas $\beta 1$. La columna se lava secuencialmente con 15 ml de tampón de lisis, 15 ml de tampón de lavado (50 mM etanolamina, 0.2% TX100, 0.5 M NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $MnCl_2$, 1 mM PMSF, pH 10). Finalmente, las integrinas $\beta 1$ unidas específicamente a la columna se eluyeron con el tampón de elución a pH 12 (50 mM etanolamina, 0.5 M NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $MnCl_2$, 1% octilglucósido, 1 mM PMSF). Se recogieron fracciones de 0.5 ml neutralizadas con 0.1 vol de 1 M Tris, pH 6.7. Las fracciones que

contenían integrinas $\beta 1$ fueron identificadas por técnicas de ELISA y por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% en presencia de SDS revelados con tinción de plata. El rendimiento de la purificación de las integrinas $\beta 1$ fue de 1.5-2 mg en 10 ml de tampón de elución neutralizado por 100 g del lisado de tejido (Bicinchoninic-Protein Assay Reagent, Pierce Chemical Co).

6) Inmunización de los ratones y generación de hibridomas (fusión celular).

Se inmunizaron a ratones hembras Balb/c inyectándoles intraperitonealmente 5-7.5 μ g de integrinas $\beta 1$ purificadas en los días -48 (en coadyuvante completo de Freund, Gibco), -33 (en coadyuvante incompleto de Freund, Gibco) y un último pinchazo intravenoso diluido en PBS a -3 días antes del sacrificio. Todas las inyecciones se hicieron en presencia de 0.2 mM de $MnCl_2$, para mantener el estado activado de las integrinas $\beta 1$. En el día 0 se sacrificó al ratón y se realizó la fusión celular de las células del bazo del ratón inmunizado (linfocitos B) con la línea celular de mieloma de ratón SP2 en una proporción de 4:1. La fusión celular se realizó según técnicas estándares, brevemente: a la mezcla de células lavadas con RPMI se le añaden 1 ml de 50% de polietilenglicol 3.000 (Merck) en RPMI, precalentado a 37 °C. Tras una incubación de 1 min 30 seg, se diluyen las células en RPMI y se lava el exceso de polietilenglicol. Por último, se resuspenden en medio RPMI/20% suero fetal bovino suplementado con el medio selectivo HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina, Gibco) y se distribuyen en placas de 96 pocillos (Costar, Cambridge), junto con los macrófagos peritoneales extraídos previamente del ratón. El medio se cambia varias veces en presencia de HAT, pasado 2 semanas se cambia a medio HT (hipoxantina-timidina, Gibco). En el momento que los híbridos celulares son lo suficientemente grandes es cuando se comienza la selección de los híbridos positivos, comprobando la reactividad de los sobrenadantes de cultivo en ensayos de ELISA y citometría de flujo. Los hibridomas que son positivos se testarán en ensayos más específicos y los que nos

interesen se clonarán por dilución límite para su posterior caracterización.

7) Técnicas de ELISA.

50 μ l de las integrinas β 1, purificadas por cromatografía de inmunoafinidad, se fijan en pocillos de fondo plano a una concentración aproximada de 10 μ g/ml (dilución 1:10) diluido en un tampón 25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.2, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se saturan los espacios libres del plástico con 200 μ l de PBS/2% BSA durante 2h/temperatura ambiente. Los pocillos se lavan y se incuban durante 30 min a temperatura ambiente con 50 μ l del correspondiente sobrenadante de cultivo de los hibridomas. A continuación, los pocillos se lavan tres veces con 200 μ l de PBS y se incuban con 50 μ l, de una dilución 1:1000 en medio RPMI, del anticuerpo secundario asociado a peroxidasa (anti-IgG de ratón desarrollado en cabra conjugado a peroxidasa, Sigma). Transcurrido ese tiempo los pocillos se lavan tres veces con PBS y se añade 100 μ l del sustrato para la peroxidasa (0.12% de O-fenilendiamina, 0.108% de H₂O₂ disuelto en 0.2 M Na₂HPO₄, 0.1 M ácido cítrico, pH 5) a cada pocillo permitiendo que la reacción se desarrolle hasta conseguir un color amarillo-marrón. La absorbancia de cada pocillo se midió a una longitud de onda de 450 nm en un lector de ELISA (SLT-Lab Instruments, Australia).

8) Técnicas de Western-Blot.

Aproximadamente, 2 μ g de integrinas β 1 purificadas por cromatografía de inmunoafinidad se separan por electroforesis en geles del 7% de poliacrilamida en presencia de SDS y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m (Bio-Rad, Madrid, España) usando un sistema de transferencia semi-seco (Bio-Rad). Después de la transferencia, la membrana se satura durante 2 h a temperatura ambiente con 5% de leche desnatada disuelta en PBS. A

continuación, la membrana se incubaba con los AcMs correspondientes 1h/temperatura ambiente. Tras los lavados necesarios se incubaba con un anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Sigma). La unión del anticuerpo se detectó desarrollando una reacción de color usando 3-amino-etilcarbazol (Sigma) como sustrato.

9) Análisis por citometría de flujo.

Hay dos pequeñas variantes, 1) dependiendo si únicamente queríamos ver la expresión del epítipo reconocido por el AcM en cualquier tipo celular, o 2) si queríamos ver como variaba la expresión de epítipos de activación de las integrinas VLA bajo diferentes condiciones de estimulación.

En el caso 1) 5×10^5 células se lavaban dos veces con RPMI incompleto y se resuspendían en 50 μ l de RPMI sobre pocillos de fondo en "U" junto con 50 μ l de sobrenadante de cultivo del correspondiente AcM o una concentración de 10 μ g/ml del AcM purificado, incubándose durante 30 min/4°C. A continuación, se lavaban las células dos veces con 100 μ l de RPMI incompleto y se incubaban durante otros 30 min/4°C con 50 μ l de una dilución 1:250 del AcM secundario conjugado con FITC (anti IgG de ratón desarrollado en oveja, Sigma). Pasado este periodo se lavaban dos veces con PBS y se fijaban las células con 200 μ l de 3% de formaldehído en PBS. La fluorescencia de los AcMs secundarios unidos a las células se determinó utilizando el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

En el caso 2) se pretende ver la variación en la expresión de los epítipos de activación reconocidos por AcMs específicos en diferentes condiciones de estimulación de las integrinas VLA. Para ello las células se lavaban dependiendo del ensayo en medio RPMI (primeros estadios de caracterización de los AcMs y se realizaban con sobrenadante de cultivo del hibridoma) o en el tampón Hepes (se realizaban con AcMs purificados y consistían en estudios más detallados de como afectaban los cationes divalentes y distintos estímulos en la expresión de los epítipos de activación reconocidos

por AcMs específicos). Las células se incubaban durante 20 min/37°C en un volumen final de 100 µl en los cuales se incluyen, además de las células, la dilución del AcM (50 µl del sobrenadante de cultivo o una concentración de 10 µg/ml del AcM purificado), los cationes divalentes y/o los quelantes apropiados junto con los estímulos que se precisen. Después se lavaban las células dos veces a 4°C con RPMI o tampón Hepes/0.5 mM Ca^{2+} + 0.5 mM Mg^{2+} (condiciones fisiológicas) y se incubaban con 50 µl de una dilución 1:250 del AcM secundario conjugado con FITC (anti IgG de ratón desarrollado en oveja, Sigma) durante 30 min a 4°C. Tras este periodo, las células se lavaban dos veces con PBS y se fijaban con 200 µl de 3% de formaldehído en PBS. La fluorescencia se determinó usando el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

10) Ensayos de adhesión celular.

Los ligandos para las integrinas $\beta 1$ ensayados en adhesión celular son colágeno, laminina y fibronectina. Estos ligandos eran fijados (40µl/pocillo) en pocillos planos de placas de 96 pocillos (Titertek, ICN, Biomedicals) a diferentes concentraciones dependiendo del tipo celular y del ensayo que se trate. La fibronectina y laminina se utilizaron a concentraciones entre 0-15 µg/ml en un tampón 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.2, y el colágeno entre 0-40 µg/ml en una solución al 0.05% de ácido acético en H_2O . Tras la incubación de los ligandos durante toda la noche a 4°C, se lavaban los pocillos con PBS y se saturaban los sitios del plástico libres durante 1h. 30 min/temperatura ambiente con 100 µl de una solución al 1% de BSA inactivada por calor en un tampón 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.2. A continuación, las placas se lavan dos veces con 100µl de PBS y una última vez con tampón Hepes (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 2 mg/ml D-glucosa, pH 7.4) o medio RPMI, dependiendo del tipo de ensayo de adhesión celular. Los ensayos de adhesión se hacen en un volumen final de 80 µl, de los cuales 40 µl corresponden a los diferentes estímulos o condiciones a las

concentraciones deseadas (AcM, ésteres de forbol, cationes divalentes o quelantes de éstos, etc.) y los otros 40 μ l las células (150.000-300.000 células/pocillo). Los pocillos, conteniendo los estímulos y las células, se incuban durante 10 min/4°C, tiempo suficiente para que las células se depositen y los estímulos se unan a sus respectivos receptores, y a continuación se incuban durante 40 min. a 37°C en el incubador de células. Finalizado ese periodo, se lavan los pocillos 3 veces con 100 μ l de PBS precalentado a 37°C, se fijan las células con 3% de formaldehído en PBS durante 10 min/temperatura ambiente, se permeabilizan 2 min con 2% metanol en PBS y las células que hallan permanecido adheridas se tiñen con una solución al 0.5% de cristal violeta en 20% metanol. Para cuantificar el número de células adheridas se eluye la tinción con 0.1 M citrato sódico pH 4.2 en 50% etanol y se mide la absorbancia a 540 nm en un lector de ELISA (SLT-Lab Instruments, Australia).

11) Marcaje radiactivo de las proteínas de la superficie celular e inmunoprecipitación.

Las proteínas extracelulares de la membrana plasmática se marcaban radiactivamente con I^{125} para analizar posteriormente qué moléculas reconocían los AcMs sobre la membrana de estas células. En primer lugar se disolvía en tubos de vidrio 1.33 mg de 1,3,4,6-tetracloro-3 α ,6 α -difenilglicoluril (Iodogen, Sigma) en 1 ml de cloroformo y se ponían 100 μ l de esa solución a otros dos tubos de vidrio, agitándolos hasta que el cloroformo se evaporase y el Iodogen se quedara pegado sobre las paredes del tubo. Las células (20-30 x 10⁶) se lavaban dos veces con PBS y se resuspendían en 600 μ l de PBS. 300 μ l de esa suspensión de células se disponían en cada tubo con Iodogen y se marcaban las proteínas de la superficie celular radiactivamente con 0.5 mCi de [I^{125}]ioduro sódico (ICN Biomedicals, Irvine, Ca) durante 15 min a temperatura ambiente, tras lo cual, la reacción se paraba con 300 μ l de 0.4% de tirosina

en PBS. Se lavaban dos veces las células con PBS, y se lisaban en 1 ml de PBS/1% TX100/1% BSA/1 mM PMSF, pH 7.4, durante 20 min a 4°C. Los lisados eran centrifugados a 7000 x g durante 30 min a 4°C, para eliminar lo que permaneciese insoluble, y dializados toda la noche frente a PBS. Posteriormente el lisado se preaclarába 2 h/4°C con 30 µl de proteína A-Sefarosa (Sigma). Para la inmunoprecipitación, cantidades iguales del lisado radiactivo preaclarádo se incubaban 2h/4°C con 100 µl del correspondiente sobrenadante de cultivo del hibridoma o una concentración de 10 µg/ml del AcM purificado. Tras este periodo, se le añadían 100 µl/muestra de sobrenadante de cultivo del AcM 187.1 (anti-IgG de ratón) durante 2h/4°C. Finalmente, los inmunoprecipitados eran separados por la adición de 30 µl de proteína A-Sefarosa, incubándolo durante 1h/4°C en continuo movimiento. Pasado este periodo las muestras se lavaban por centrifugación a 200 x g con 500µl/muestra de los siguientes tampones: tres veces con PBS/0.1% BSA/0.1% TX100, un cuarto lavado con PBS, y el último lavado con 50 mM de Tris pH 6.7. Se elimina el líquido sobrante, se le añade 50 µl de tampón de muestra, se hierve durante 5 min y las muestras se analizan en geles de poliacrilamida 7% o 8%, seguido de la exposición en películas de autorradiografía con pantallas potenciadoras de la señal.

Para demostrar la naturaleza de la molécula reconocida por los AcMs HUTS hicimos la inmunoprecipitación en distintas condiciones de activación de las integrinas en presencia de determinados cationes divalentes. El proceso es similar al anterior, pero con unas pequeñas variaciones. Los linfoblastos T se marcaban radiactivamente con I^{125} y se lisaban en un tampón 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1% TX100, 1% BSA, 1 mM PMSF, pH 7.4. Después de la centrifugación, diálisis y preaclaramiento, a alicuotas del lisado se le añadían durante 15 min a 4°C los respectivos cationes divalentes Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} a concentraciones finales de 1mM. Tras lo cual se incubaban con el AcM correspondiente siguiendo el mismo proceso explicado en el caso anterior, manteniendo los cationes divalentes en todos los pasos del experimento.

Las inmunoprecipitaciones de las subunidades disociadas de las integrinas VLA se llevaron a cabo por el tratamiento de los lisados celulares radiactivos a condiciones de alto pH. Los linfoblastos T se marcaban radiactivamente con I^{125} y se lisaban en un tampón 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% TX100, 1 mM Mn^{2+} , 2% BSA, 1 mM PMSF, pH 8. Después del procesamiento de los lisados, alícuotas de los lisados celulares eran mezcladas con un exceso de 10 veces (v/v) de 10 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.2% TX100, 1 mM Mn^{2+} , pH 8; o 20 mM trietilamina, 500 mM NaCl, 0.2% TX100, 1 mM Mn^{2+} , pH 11. Estas muestras se incubaban durante 30 min a 37 °C y rápidamente neutralizadas por la adición de 1/10 volúmenes de 1 M Tris-HCl pH 6.8. A partir de aquí el procesamiento y análisis de las muestras se llevaron a cabo como se describe anteriormente.

12) Marcaje radiactivo de fibronectina y ensayo de unión de fibronectina soluble a diferentes tipos celulares.

El marcaje radiactivo de la fibronectina consistió en: inicialmente, 0.1 mg de Iodogen (Sigma) se disuelve en 1 ml de cloroformo, se disponen 50 μ l a cada tubo de vidrio y se deja evaporar en continua agitación. 150 μ l de fibronectina (a una concentración de 2 mg/ml) se diluye en 335 μ l del tampón borato (0.01 M tetraborato sódico, 0.14 M NaCl, pH 8.2) y se reparte en tres tubos con Iodogen incubándose durante 10 min/temperatura ambiente con 0.75 mCi totales de $[I^{125}]$ ioduro sódico (ICN Biomedicals, Irvine, Ca). Pasado este tiempo, la reacción se para con 90 μ l de 0.4 mg/ml tirosina en tampón borato y 450 μ l de 1 mg/ml IK en PBS, 1% BSA y se añade PMSF a una concentración final de 1 mM. La muestra se dializa frente a varios cambios en PBS a 4°C y se almacena a -20°C.

Los ensayos de unión de fibronectina soluble a los distintos sistemas celulares se realizaron del siguiente modo: las células se lavan dos veces en el tampón de unión (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mg/ml glucosa y 1% BSA) y se resuspenden (5×10^6 células) en el tampón de unión/0.5 mM Ca^{2+} + 0.5 mM Mg^{2+} (condiciones fisiológicas) en un volumen final de 50 μ l donde están presentes determinadas

concentraciones de fibronectina- I^{125} junto con los correspondientes estímulos: cationes divalentes (Mn^{2+}), AcMs (X63, TS2/16 y HUTS-21) y ésteres de forbol (PdBu). Al mismo tiempo, se realiza por cada muestra un desplazamiento de la unión de fibronectina- I^{125} con un exceso de 10 veces de fibronectina fría, para más tarde poder calcular la unión específica. Las muestras se incuban durante 30 min a temperatura ambiente, tras lo cual se llevan a tubos de microcentrífuga sobre 300 μ l de Dibutil phthalato y se centrifuga 3 min a 7.000 rpm. Las puntas de los tubos, que contienen únicamente las células y lo que se hubiese unido a ellas, se cortan y se cuantifica la cantidad de fibronectina- I^{125} presente utilizando un contador gamma. La unión específica de la fibronectina soluble marcada radiactivamente a los respectivos sistemas celulares es el resultado de: la unión de fibronectina- I^{125} menos la unión de la misma concentración de fibronectina- I^{125} en presencia de diez veces de exceso de fibronectina sin marcar.

$$U.E. = Fn^* - (Fn^* + 10 \times Fn)$$

13) Biotinilización de los AcMs.

Los AcMs purificados a una concentración aproximada de 2 mg/ml se dializan toda la noche a 4°C frente a un tampón borato pH 9.4 (0.1 M ácido bórico, 0.025 M tetraborato sódico, 0.075 M cloruro sódico). Al día siguiente se disuelve la biotina (N-hidroxisuccinimido-biotina, Sigma) en dimetilsulfóxido a una concentración de 2 mg/ml y se la añade a la muestra dializada de los AcMs dispuesta en tubos de vidrio a una concentración final de 0.1 mg de biotina/ml de AcM. Después de la incubación en continua agitación durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad, la biotina no conjugada se eliminó dializando la muestra varias veces frente a PBS/0.02% azida sódica. Los AcMs biotinilados se almacenan en el mismo tampón de diálisis a 4°C.

14) Ensayo de competición de epítomos entre distintos AcMs.

Los linfoblastos T se lavan dos veces con el tampón

Hepes/0.5 mM Mn^{2+} y se resuspenden ($3-5 \times 10^5$ células/pocillo) en pocillos de fondo en U, donde se preincubaban con un exceso de AcM frío (15-20 $\mu g/ml$) durante 10 min a 37°C. A continuación se le añaden 2 μg del correspondiente AcM biotinilado durante otros 15 min a 37°C. Pasado este tiempo, las células se lavan dos veces con 100 μl del tampón Hepes a 4°C y se le añaden 50 μl de avidina-FITC (Sigma) en Hepes/NaCl/1% BSA a una dilución 1:300. Tras 30 min/4°C las células se lavan dos veces con PBS y se fijan con una solución al 3% de formaldehído en PBS. La fluorescencia se determina usando el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

15) Mapeo de los epítomos reconocidos por distintos AcMs en la subunidad $\beta 1$.

Células de ovario de hamster chino fueron transfectadas con distintas quimeras de la subunidad $\beta 1$ de las integrinas VLA entre humano y ratón (Takada y Puzon, 1993). Aproximadamente, 10^7 células transfectadas fueron lisadas en 1 ml de 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% TX100, 0.05% Tween 20, pH 7.4. La subunidad $\beta 1$, tanto la nativa como las quiméricas, se inmunopurificaron con el AcM anti- $\beta 1$ humano A1A5 acoplado a sefarosa. Lo que permaneció unido específicamente a la sefarosa-A1A5 después de los lavados, se recuperó hirviéndolo durante 5 min con el tampón de muestra conteniendo 1% de SDS y separado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7% en presencia de SDS. Las proteínas fueron transferidas a la membrana Immobilon-P (Millipore, Bedford) y la membrana fue bloqueada por incubación durante 1 h a temperatura ambiente con una solución que contenía 1% de leche en polvo. La membrana se incubó con los AcMs correspondientes 1h/temperatura ambiente. Tras los lavados necesarios se incubaron con un anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Sigma) y el kit de ECL (Amersham, Buckinghamshire, UK) se utilizó para detectar la unión del anticuerpo.

16) Técnicas de microscopía de fluorescencia.

En primer lugar, los cubreobjetos se tapizan con fibronectina a una concentración de 10 µg/ml en un tampón 25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.2, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se saturan los sitios libres con una solución de 1% BSA en PBS y se permite la adhesión celular durante 40 min/37°C en presencia de los estímulos especificados. Tras lo cual se lavan las células no adheridas y las que permanecen se fijan con una solución de formaldehído al 3% en PBS/10 min/temperatura ambiente. Posteriormente, se permeabilizan con TX-100 al 0.1% en PBS y se tiñen con faloidina-TRITC. El análisis de la forma celular se realizó mediante fotomicroscopía utilizando Nikon Labophot-2 con objetivos de inmersión de 100x aumentos y fotografiadas con películas Ektachrome 400.

4. RESULTADOS

4.1. PURIFICACIÓN DE INTEGRINAS $\beta 1$.

Las integrinas $\beta 1$ se purificaron por cromatografía de inmuoafinidad en condiciones de activación de las integrinas a partir de diferentes tejidos humanos como se explica en materiales y métodos. Las integrinas $\beta 1$ se eluyeron específicamente utilizando el tampón de elución a pH 12 y el rendimiento de la purificación fue de 1.5-2 mg de integrinas VLA purificadas en 10 ml de tampón de elución neutralizado. En la **fig. 1** se muestra un gel de poliacrilamida al 7% en presencia de SDS con tinción de plata en el que se muestran los resultados de la purificación, que se corroboraron posteriormente con datos de ELISA.

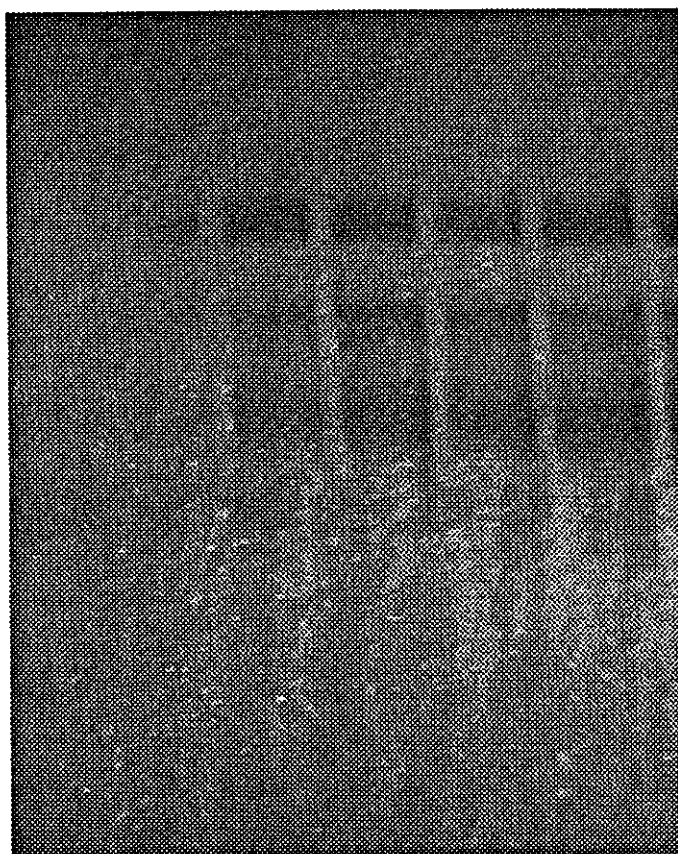


figura 1. Gel de poliacrilamida al 7% en presencia de SDS donde se muestran los resultados, mediante tinción de plata, de la purificación de las integrinas $\beta 1$.

4.2. OBTENCIÓN DEL ACM INHIBIDOR DE LA ADHESIÓN CELULAR MEDIADA POR VLA-1: 5E8D9.

4.2.1. Hibridomas productores de AcMs que reconocen integrinas $\beta 1$.

Para el desarrollo de este objetivo, inmunizamos ratones hembras Balb/c con fracciones de integrinas $\beta 1$ purificadas a partir de un lisado de bazo humano, según el protocolo explicado en materiales y métodos. A continuación, realizamos la fusión celular entre los linfocitos B del bazo de ratón inmunizado y las células SP2 de mieloma de ratón. Tras el crecimiento de los hibridomas, la primera selección de los híbridos productores de AcMs que reconocían las integrinas $\beta 1$ se realizó comprobando la reactividad de los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas en ensayos de ELISA sobre placas de 96 pocillos de fondo plano recubiertos con integrinas $\beta 1$, a una dilución testada anteriormente de 1:10. El resultado fue de aproximadamente 150 híbridos positivos de 576 sobrenadantes testados (tabla 1).

AcMs	Absorb. (450nm)	AcMs	Absorb. (450nm)
X63 (negativo)	0.18	3B11	0.7
TP1/40 (CD11a)	0.16	3D9	0.20
TS2/16 (CD29)	0.6	4H8	0.48
Tea1/41 (CD49b)	0.22	5E8	0.22
HP2/1 (CD49d)	0.21	5F4	0.56
1A10	0.33	6C10	0.1
2G9	0.12	6H3	0.38

tabla 1. Resumen representativo de los datos de ELISA obtenidos para algunos sobrenadantes de cultivo producido por los hibridomas. Los sobrenadantes de cultivo se testaron observando la reactividad frente a las integrinas $\beta 1$ purificadas (1:10) fijadas a pocillos planos y por técnicas de ELISA como figura en materiales y métodos.

4.2.2. Selección de los AcMs positivos en ELISA que inhiben la adhesión a ligandos de VLA-1.

Los sobrenadantes de cultivo de los híbridos positivos en el ensayo de ELISA, se utilizaron para ver la capacidad de inhibición de la adhesión de las líneas celulares de neuroblastoma NB100 y melanoma DX3 a los ligandos para VLA-1 laminina y colágeno de tipo I. El sistema de adhesión es específico para integrinas VLA, como se muestra por la inhibición total de la adhesión celular en presencia del AcM inhibidor anti- $\beta 1$ Lia 1/2.

De todos los sobrenadantes testados, únicamente el correspondiente al híbrido 5E8 era capaz de inhibir totalmente la adhesión de NB100 a colágeno de tipo I, sin embargo, la adhesión a laminina no era alterada por la presencia de este AcM. En el caso de DX3, el AcM 5E8 no afectaba en ninguno de los dos casos a la adhesión celular (**fig. 2**). Esto podría sugerir que las células se unen a esos ligandos utilizando otros receptores de la familia de las integrinas VLA.

Una vez obtenido, el AcM 5E8 fue clonado por dilución límite, seleccionando el clon D9, con el cual completamos todo el estudio. El AcM 5E8D9 (IgG2a) purificado (10 $\mu\text{g/ml}$) se comportaba de la misma manera en los ensayos de adhesión que el híbrido original (**fig. 2**) en condiciones controladas de cationes divalentes (tampón Hepes/ Ca^{2+} (2mM) + Mg^{2+} (2mM)).

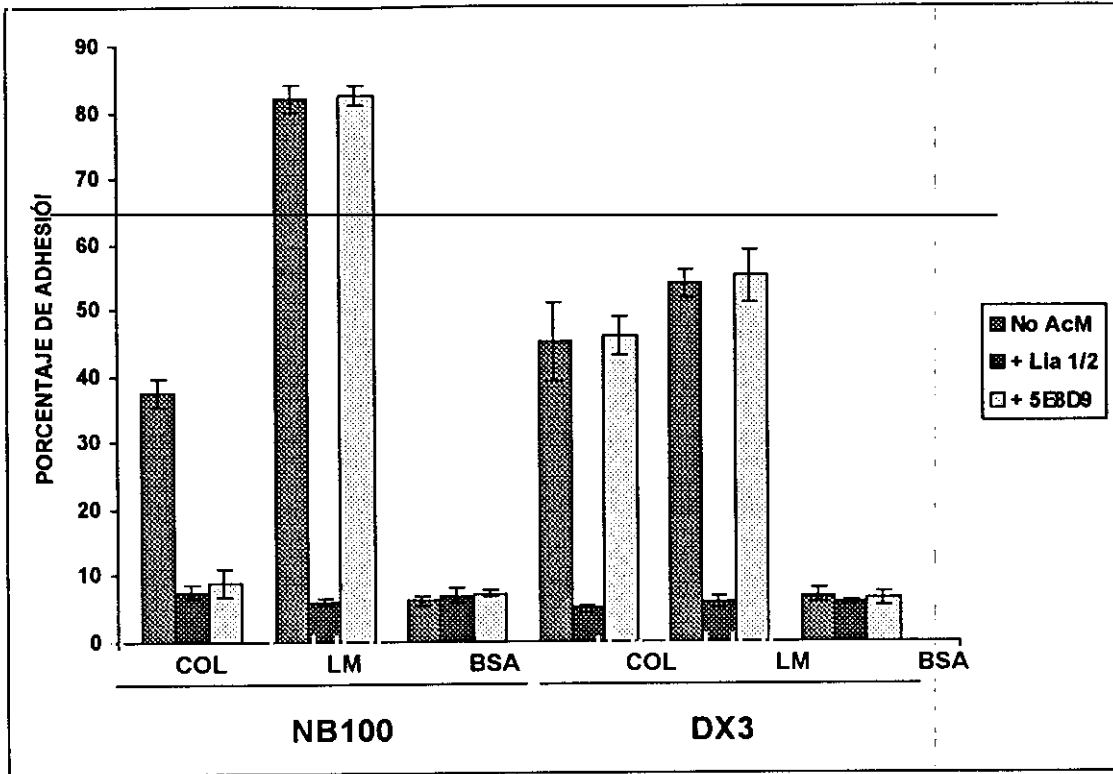


Fig.2. La adhesión de la línea celular de neuroblastoma humano NB100 a colágeno de tipo I se bloquea con el AcM anti-VLA-1 5E8D9, pero no inhibe la adhesión a laminina. La adhesión de células de melanoma humano DX3 a colágeno de tipo I o laminina no se vió alterada por la presencia del AcM 5E8D9. El sistema era dependiente de integrinas $\beta 1$ como muestra por la inhibición total utilizando el AcM anti- $\beta 1$ bloqueador Lia1/2. Los ligandos se plaquearon a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados de la adhesión celular fueron idénticos, realizándose independientemente en RPMI con CSN de los AcMs o en condiciones controladas de cationes divalentes 2 mM Mg^{2+} , 2mM Ca^{2+} en tampón Hepes con 10 $\mu\text{g/ml}$ de los correspondiente AcMs.

4.2.3. El AcM 5E8D9 reconoce VLA-1.

La naturaleza de la molécula reconocida por el AcM 5E8D9 sobre la superficie celular se determinó utilizando técnicas de inmunoprecipitación a partir de lisados celulares de NB100 y DX3, previamente marcados radiactivamente con ^{125}I . El AcM 5E8D9 inmunoprecipitaba una banda correspondiente a 200 kDa asociada a una banda de 130 kDa. Estos pesos moleculares coincidían con los descritos para $\alpha 1$ (CD49a) y la subunidad común de las integrinas

VLA: $\beta 1$ (CD29) respectivamente. De la misma manera, al inmunoprecipitar con el AcM control anti-VLA-1, TS 2/7, se mostraban las dos bandas correspondientes al heterodímero $\alpha 1 \beta 1$, lo cual indica que el AcM 5E8D9 reconoce específicamente la subunidad $\alpha 1$ de la integrina VLA-1 (fig. 3).

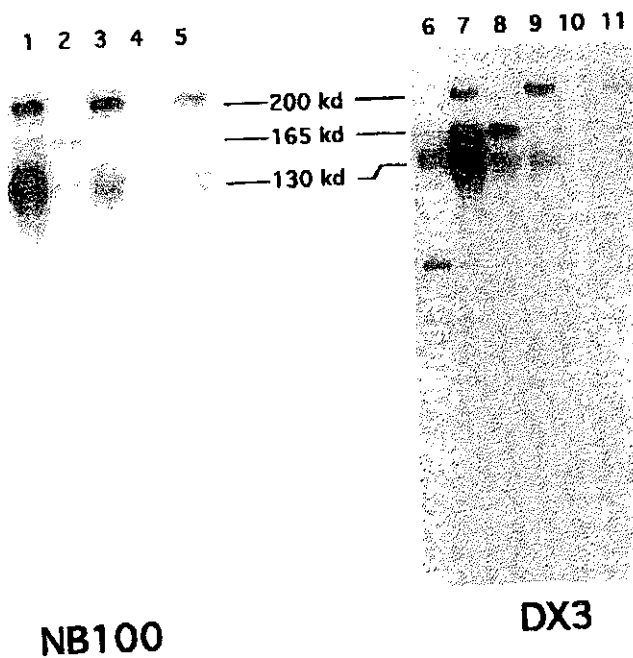


Figura 3. Inmunoprecipitación con el AcM 5E8D9 a partir de lisados marcados con ^{125}I de las líneas celulares NB100 y DX3. El AcM inmunoprecipitaba dos bandas de 200 y 130kDa (líneas 5 y 11) que corresponden al heterodímero VLA-1 como se determina por comparación con el AcM control anti-VLA- $\alpha 1$ (CD49a) TS2/7 (líneas 3 y 9). Otros AcMs controles fueron: HC1/1 (CD11c) líneas 4 y 10, TS2/16 (CD29) líneas 1 y 7, Teal/41 (CD49b) líneas 2 y 8, y HP2/1 (CD49d) línea 6. Los inmunocomplejos se aislaron y las muestras reducidas se analizaron en geles de poliacrilamida al 8% en presencia de SDS y autorradiografiados como se explica en materiales y métodos.

En técnicas de análisis por citometría de flujo, el AcM 5E8D9 presentaba los mismos patrones de expresión que los obtenidos para el AcM control anti-VLA-1 TS2/7, lo que confirma la especificidad por el reconocimiento de la subunidad $\alpha 1$ del AcM 5E8D9 (fig. 4).

4.2.4. Expresión de receptores de colágeno y laminina por las líneas celulares NB100 y DX3.

Siendo VLA-1 receptor para colágeno y laminina, el AcM anti-VLA-1 5E8D9 únicamente inhibe la adhesión celular de NB100 a colágeno de tipo I. Para dar una explicación a la falta de inhibición por parte del AcM 5E8D9 en la adhesión celular a colágeno de tipo I en células DX3 y a laminina en ambos sistemas celulares decidimos analizar los receptores de colágeno y laminina que presentan estas líneas celulares. Estos receptores pueden ser: VLA-1 (colágeno y laminina), VLA-2 (colágeno y laminina), VLA-3 (fibronectina, colágeno y lamina) y VLA-6 (laminina). El tipo de receptores y el nivel de expresión en cada línea celular van a configurar la capacidad de adhesión a los ligandos. En la **fig. 4** se observan perfiles de citometría de flujo en los que se aprecian la expresión de dichos receptores. En los dos sistemas celulares se observa una gran expresión de VLA-6, lo que explica la falta de inhibición de la adhesión a laminina en presencia del AcM anti-VLA-1 5E8D9. En NB100 la expresión de VLA-1 es muy alta, comparándola con los niveles de expresión de VLA-2 y VLA-3, por lo que la adhesión celular a colágeno se realiza principalmente a través del heterodímero VLA-1, siendo por tanto susceptible de ser inhibida por el AcM 5E8D9. Por el contrario en el caso de DX3, el nivel de expresión de VLA-1 es bastante reducido con respecto a los de VLA-2 y VLA-3, y esto explicaría por qué el AcM 5E8D9 no ejerce nignun efecto inhibitorio en la adhesión de DX3 a colágeno de tipo I.

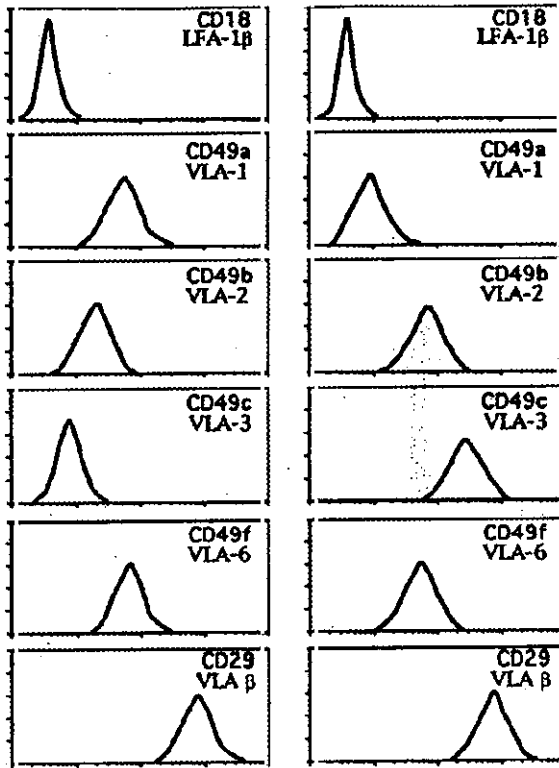


Figura 4. Expresión sobre la superficie de las líneas celulares NB100 y DX3 de los receptores de la familia de las integrinas VLA para colágeno y laminina. Los AcMs utilizados para analizar el nivel de expresión de las subunidades de integrinas por citometría de flujo fueron: el control negativo Lia3/2 (CD18), VLA-1 α TS2/7 o 5E8D9 (CD49a), VLA-2 α Teal/41 (CD49b), VLA-3 α PlB5 (CD49c), VLA-6 α GoH3 (CD49f) y anti- β 1 TS2/16 (CD29).

4.2.5. Regulación funcional de VLA-1.

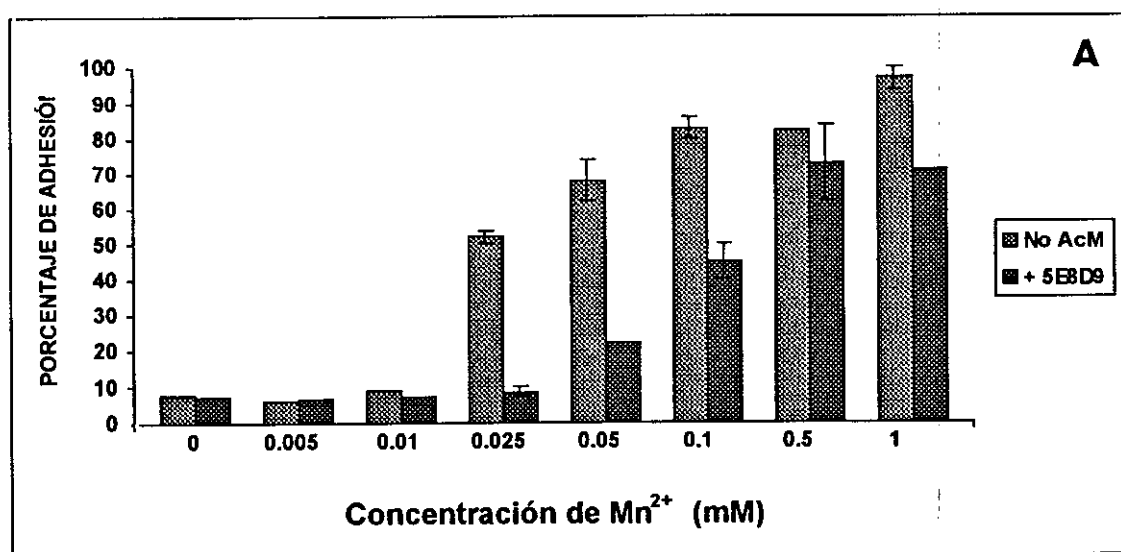
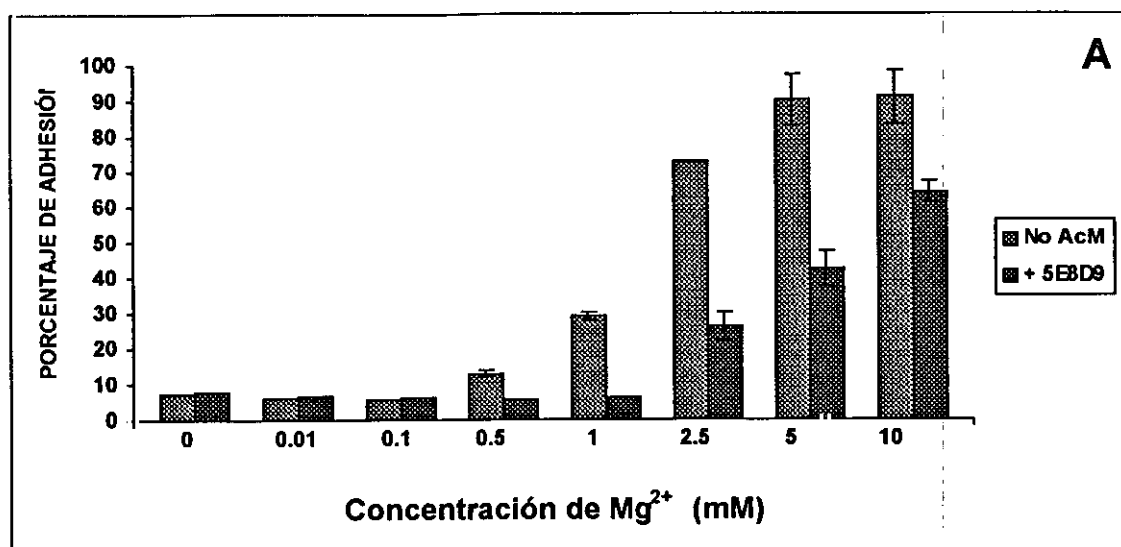
Los estudios de la regulación de la actividad funcional de la integrina VLA-1 por cationes divalentes, se llevaron a cabo utilizando ensayos de adhesión de NB100 a colágeno de tipo I, realizados en tampón Hepes donde se incluyeron los correspondientes cationes divalentes y AcMs a las concentraciones indicadas.

4.2.5.1. Mg^{2+} y Mn^{2+} inducen activación de VLA-1.

Concentraciones crecientes de los cationes divalentes Mg^{2+} o Mn^{2+} incrementan el porcentaje de adhesión de la línea celular NB100 a colágeno de tipo I de una forma dosis-dependiente (**fig. 5A**). La concentración mínima de Mg^{2+} requerida para la efectividad de la adhesión mediada por VLA-1 es 50 veces mayor que la necesaria en el caso de Mn^{2+} , coincidiendo con lo que se ha descrito para otras integrinas (Dransfield y col. 1992). A concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} (1-2 mM) o Mn^{2+} (0.05-0.1 mM) la adhesión de NB100 a colágeno de tipo I es debida casi exclusivamente a VLA-1, como se indica por la fuerte inhibición de la adhesión ejercida por la presencia del AcM 5E8D9. A concentraciones más elevadas de los cationes, el efecto inhibitorio de adhesión del AcM 5E8D9 no es tan potente, debido posiblemente a la activación de los otros receptores para colágeno: VLA-2 y VLA-3, que aunque presentes en bajos niveles de expresión celular su activación por cationes divalentes sería suficiente para soportar ese aumento en la adhesión. En estos experimentos, y en los que se realizan en ausencia de cationes divalentes, se ve reflejada la necesidad de los cationes divalentes para la funcionalidad del heterodímero VLA-1 (**fig. 5A y 6A**).

4.2.5.2. Efecto inhibitorio del ión Ca^{2+} .

La adhesión celular de NB100 a colágeno de tipo I mediada por VLA-1 es inhibida por la presencia de Ca^{2+} (2mM) en el medio (**fig. 5B**). Para ver el efecto que realmente ejerce el Ca^{2+} en la adhesión celular de NB100 a colágeno de tipo I, hicimos ensayos de adhesión, en condiciones favorables de adhesión mediada por VLA-1, en presencia de una concentración fija de Mg^{2+} (2mM), variando la concentración de Ca^{2+} . Concentraciones crecientes de Ca^{2+} ejercía un efecto inhibitorio de la adhesión celular de NB100 a colágeno de tipo I mediada por VLA-1.



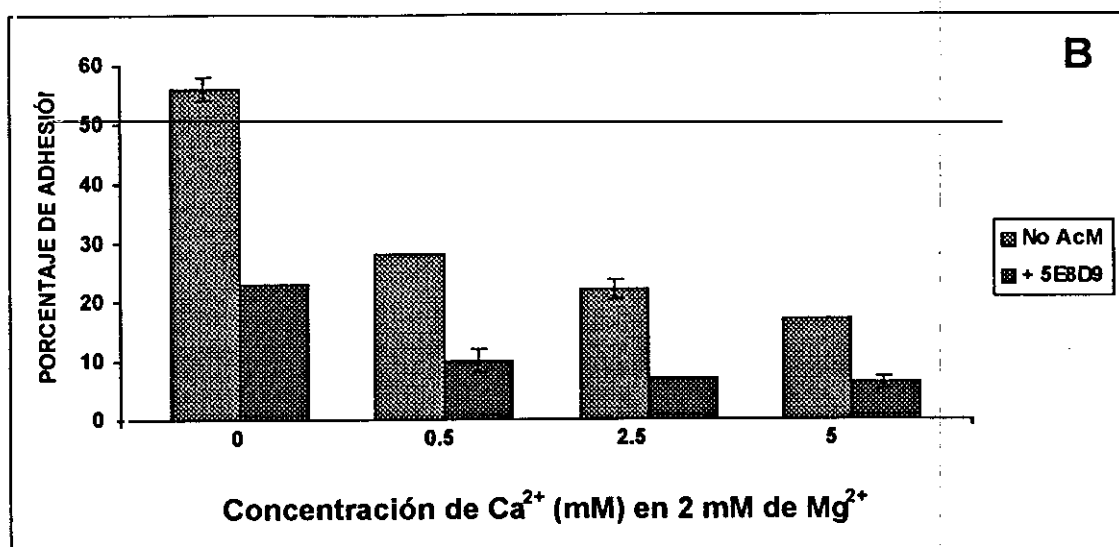
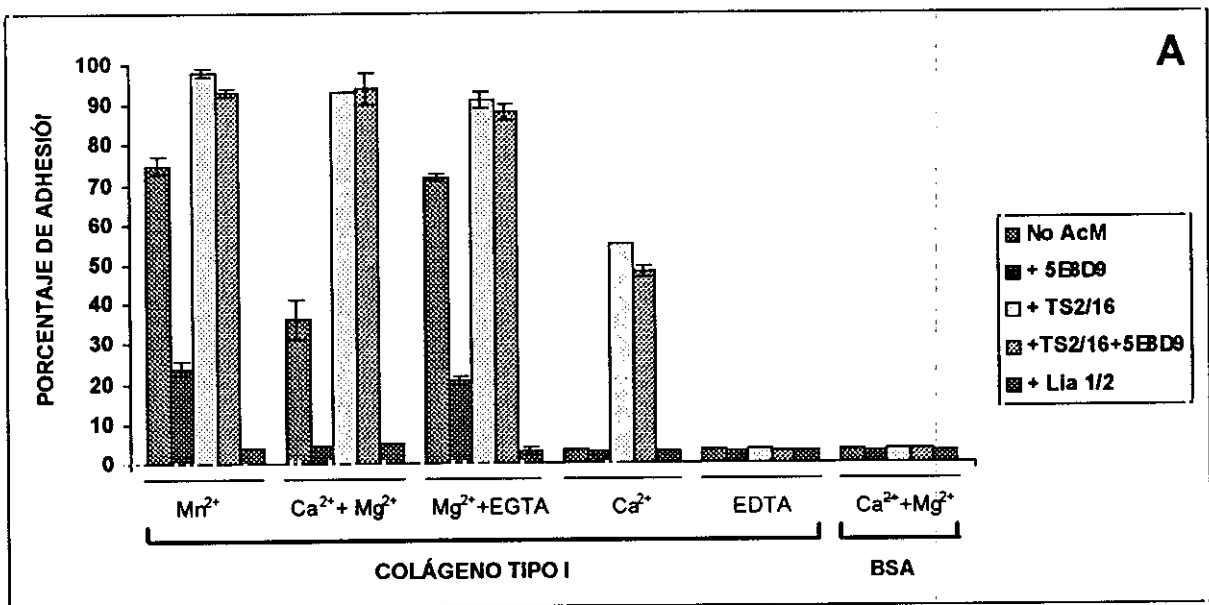


Figura 5. Dependencia de los cationes divalentes en la adhesión mediada por VLA-1 de la línea celular de neuroblastoma humano NB100 a colágeno de tipo I. **A)** Mg^{2+} (en presencia de 1mM de EGTA) a concentraciones en el rango de mM y Mn^{2+} en el rango de μM inducen adhesión celular a colágeno de tipo I mediada por VLA-1 de una manera dosis-dependiente. **B)** Ca^{2+} inhibe la adhesión celular mediada por VLA-1 inducida por 2mM de Mg^{2+} de una manera dosis-dependiente. La concentración final del AcM 5E8D9 es de 10 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.5.3. El AcM TS2/16 activa VLA-1 y VLA-2.

El AcM TS2/16 reconoce un epítipo en la subunidad $\beta 1$ de las integrinas VLA que induce un aumento en la afinidad por sus respectivos ligandos, resultando en un incremento de la adhesión celular a los respectivos ligandos. Esto se ha descrito para VLA-3 (Weitzman y col. 1993), VLA-4 (Masumoto y Hemler, 1993), VLA-5 (Arroyo y col. 1992) y VLA-6 (Chan y Hemler, 1993). Nuestro propósito era averiguar si el AcM TS2/16 era capaz de activar la integrina VLA-1 induciendo un aumento en la adhesión de NB100 a colágeno de tipo I. Los ensayos de adhesión celular se realizaron en tampón Hepes/NaCl en presencia de los cationes divalentes indicados. Como control, teníamos que en los casos que se permitía la adhesión celular, ésta se podía inhibir con el AcM 5E8D9. El AcM TS2/16 estimulaba la adhesión de NB100 a colágeno de tipo I en todos los casos, excepto en ausencia de cationes divalentes (EDTA). En todos estos casos el AcM 5E8D9 no podía revertir el aumento de

la adhesión producida por el AcM TS2/16, lo que indica que también se está produciendo una activación de los otros receptores para colágeno, VLA-2 y VLA-3, que están presentes en estas células, aunque sea en bajas proporciones (fig. 6A). TS2/16 era capaz de estimular la adhesión incluso en la condición desfavorable de adhesión celular en presencia de Ca^{2+} , por lo que decidimos hacer ensayos de inhibición de la adhesión en estas condiciones. La inhibición de la adhesión de NB100 a colágeno de tipo I por el AcM 5E8D9 era muy débil, pero realmente tenía un claro efecto inhibitorio en la adhesión celular cuando se incubaba junto con el AcM 12F1, inhibidor de la adhesión celular mediado por VLA-2. Todos estos resultados indican que el AcM TS2/16 activa VLA-1 y VLA-2 (fig. 6B).



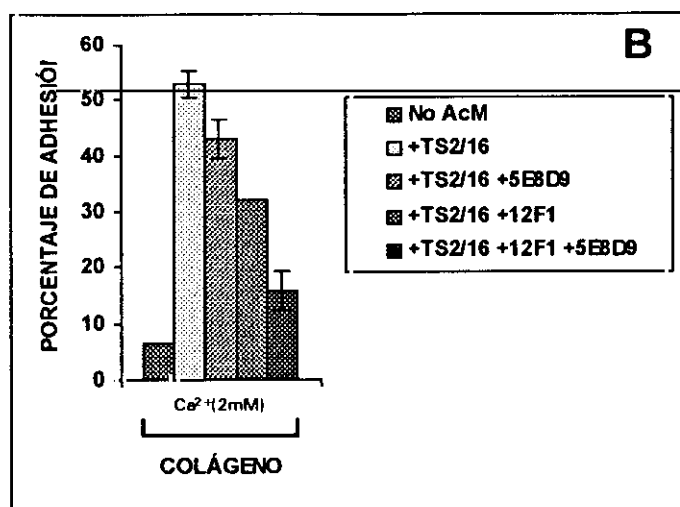


Figura 6. El AcM estimulador anti- $\beta 1$ TS2/16 activa VLA-1 en células NB100. **A)** El AcM TS2/16 induce un importante incremento en la adhesión celular a colágeno de tipo I bajo todas las condiciones de cationes divalentes. El AcM TS2/16 no fue capaz de aumentar la adhesión celular a colágeno de tipo I ni en ausencia de cationes divalentes (EDTA) ni a albúmina de suero bovino (BSA) en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} . **B)** El incremento en la adhesión celular a colágeno de tipo I inducido por el AcM TS2/16 es inhibida por AcMs anti-VLA-1 (5E8D9) y anti-VLA-2 (12F1). Concentraciones de cationes divalentes utilizadas: [Mn^{2+}], 50 μM ; [Ca^{2+} + Mg^{2+}], 1 mM Ca^{2+} /2 mM Mg^{2+} ; [Mg^{2+} + EGTA], 2 mM Mg^{2+} /1mM EGTA; [Ca^{2+}], 2mM; [EDTA], 2mM. Todos los AcMs se utilizaron a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.3. ACMS QUE RECONOCEN EPÍTOPOS DE ACTIVACIÓN EN LA SUBUNIDAD $\beta 1$ DE LAS INTEGRINAS VLA: HUTS-4, HUTS-7 Y HUTS-21.

4.3.1. Selección de AcMs con distinta reactividad en diferentes condiciones de activación de las integrinas VLA.

Al igual que en el caso descrito para la obtención del AcM 5E8D9, en primer lugar purificamos integrinas $\beta 1$ (materiales y métodos) por cromatografía de inmunoadfinidad en condiciones de activación (en presencia de 0.2 mM de Mn^{2+} y utilizando una columna del AcM TS2/16-sefaroza) a partir de una mezcla de lisados de pulmón, hígado y músculo esquelético humanos. A continuación se inmunizó a los ratones con aproximadamente 7.5 $\mu\text{g}/\text{inyección}$ de la

preparación de las integrinas $\beta 1$ purificadas y se realizó la fusión celular para la obtención de los hibridomas (materiales y métodos). Tras dos semanas del crecimiento de los hibridomas, se recogió y se testó el sobrenadante de cultivo. La selección de estos AcM se realizó mediante técnicas de citometría de flujo, viendo la reactividad diferencial de los AcM sobre linfoblastos T en dos condiciones de activación de integrinas: 1) En presencia de EDTA (3 mM), es un quelante de los cationes divalentes y representa un estado de no activación de las integrinas y 2) En condiciones de activación de las integrinas, administrando Mn^{2+} (0.5 mM) en el medio de la reacción. Utilizamos el sistema de linfoblastos T por que las integrinas VLA expresadas en estas células pueden ser rápidamente activadas por el AcM anti- $\beta 1$ TS2/16 y/o en presencia de Mn^{2+} extracelular. Tres AcM producidos por tres hibridomas distintos presentaban una reactividad diferencial bajo estas dos condiciones de cationes: una mayor expresión de los epítomos reconocidos por los AcM sobre linfoblastos T en presencia de Mn^{2+} (fig.7A). Estos hibridomas se clonaron por dilución límite basándose en la mayor reactividad de los AcM sobre linfoblastos T en presencia de Mn^{2+} , resultando en los tres clones diferentes llamados HUTS-4 (IgG2b), HUTS-7 (IgG1) y HUTS-21 (IgG2b).

Interesantemente, hay una relación directa entre la expresión de los epítomos reconocidos por los AcMs HUTS y la capacidad de la adhesión de los linfoblastos T a los ligandos de las integrinas VLA. En la fig.7B, se muestran los resultados de los ensayos de adhesión celular a diferentes ligandos de las integrinas $\beta 1$. Se observa como en ausencia de cationes divalentes (EDTA) no hay adhesión celular a ninguno de los ligandos ensayados, mientras que en presencia de Mn^{2+} y/o el AcM TS2/16 si hay un aumento en la adhesión celular, todo ello coincidente con la expresión de los epítomos HUTS.

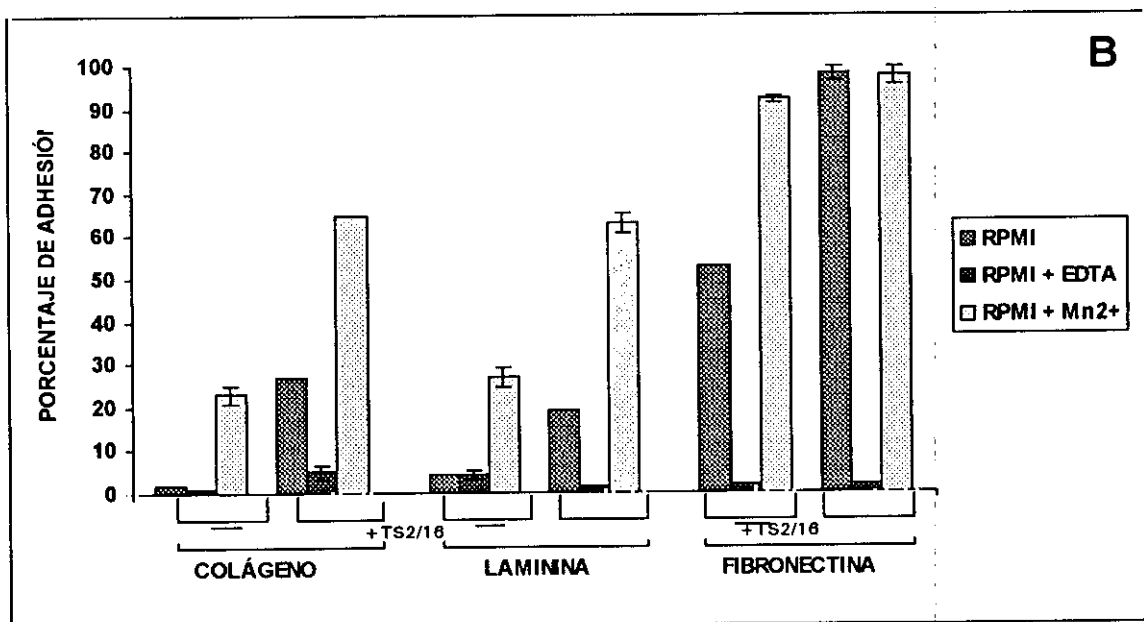
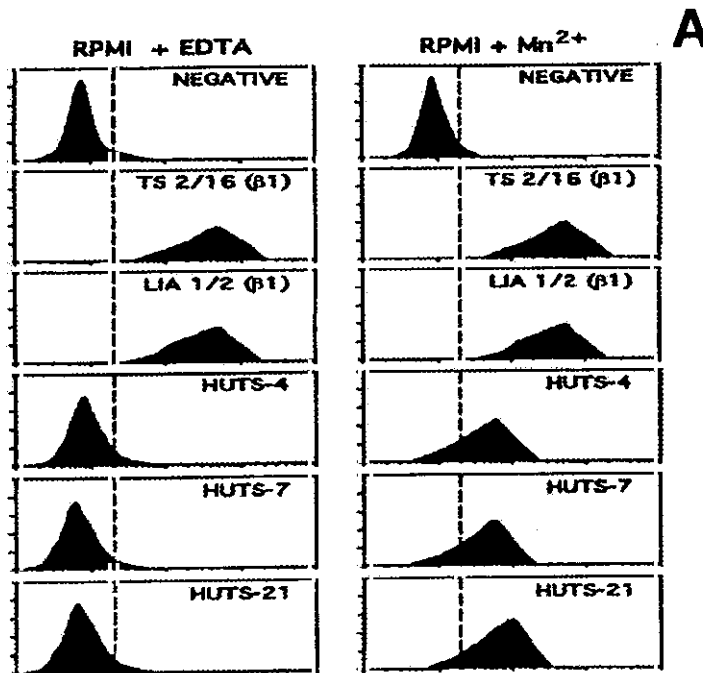


Figura 7. La expresión de los epítomos reconocidos por los AcMs HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21 en linfoblastos T es inducida por Mn^{2+} y se correlaciona con la adhesión celular mediada por integrinas $\beta 1$. **a)** Análisis por citometría de flujo de la expresión diferencial de los epítomos que reconocen los Acms HUTS en linfoblastos T dependiendo si la incubación se hace en ausencia de cationes divalentes (3mM de EDTA) o en RPMI + 1mM de Mn^{2+} (panel derecho). **B)** La adhesión de linfoblastos T a ligandos de las integrinas $\beta 1$ colágeno tipo I (20 $\mu g/ml$), laminina (10 $\mu g/ml$) y fibronectina (10 $\mu g/ml$) es estimulada por la adición de Mn^{2+} (1mM) al medio

extracelular y el anti- $\beta 1$ TS2/16 (5 $\mu\text{g/ml}$) y totalmente bloqueada en ausencia de cationes divalentes extracelulares (3mM de EDTA).

4.3.2. Los AcMs HUTS reconocen la subunidad $\beta 1$ (CD29).

La caracterización bioquímica de la molécula reconocida por los AcM HUTS se realizó por técnicas de Western-Blot y de inmunoprecipitación.

4.3.2.1. Análisis por Western-Blot.

Hicimos electroforesis de preparaciones de integrinas VLA purificadas (aproximadamente 2 $\mu\text{g/calle}$) en geles de poliacrilamida al 7% en presencia de SDS en condiciones no reductoras y transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. Estas membranas se procesaron con los respectivos AcM (materiales y métodos). En la **fig.8** se muestra como el AcM HUTS-21 reconoce una banda de igual peso molecular que el AcM TS2/16, que corresponde a la subunidad $\beta 1$. Esto sugiere que el AcM HUTS-21 puede estar reconociendo la subunidad $\beta 1$ (datos similares se obtuvieron para los AcMs HUTS-4 y HUTS-7).

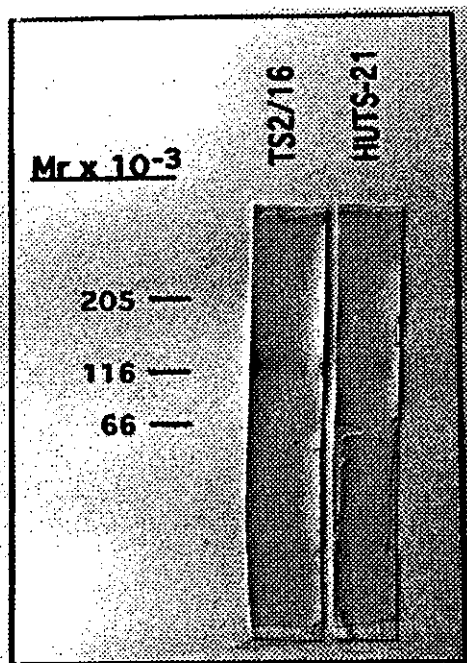


Figura 8. Muestras de integrinas $\beta 1$ purificadas (2 $\mu\text{g}/\text{calle}$) se separaron por electroforesis en presencia de SDS y transferidas a membrana de nitrocelulosa y analizados mediante técnicas de Western-Blot. Los AcMs HUTS reconocen una banda del mismo peso molecular que el AcM anti- $\beta 1$ TS2/16. Los AcMs se utilizaron a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.3.2.2. Técnicas de inmunoprecipitación.

En todos los casos, la inmunoprecipitación se realizó a partir de lisados de linfoblastos T marcados radiactivamente con ^{125}I , incubación e inmunoprecipitación con los respectivos AcMs, y analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (materiales y métodos). Para reafirmar la especificidad del reconocimiento de la subunidad $\beta 1$ por parte de los AcMs HUTS, se llevó a cabo la inmunoprecipitación desde tres puntos de vista: 1) en condiciones de ausencia de cationes divalentes, 2) en presencia de determinadas concentraciones de cationes divalentes, y 3) previo tratamiento de los lisados celulares- ^{125}I a un alto pH para conseguir la disociación de las integrinas en sus subunidades y posterior inmunoprecipitación.

4.3.2.2.1. En ausencia de cationes divalentes.

La lisis de los linfoblastos T marcados radiactivamente con ^{125}I se realizó en un tampón de lisis estándar sin cationes divalentes (1% TX100, 1% BSA en PBS, pH 7.4). Los AcMs HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21 inmunoprecipitan una banda con una movilidad electroforética similar a la que corresponde a la subunidad $\beta 1$: 130 kDa en condiciones reductoras y 110 kDa en no reductoras (**fig. 9A**). Además de los controles para miembros de la familia VLA, en la figura 9A se muestra el inmunoprecipitado correspondiente al AcM control anti- $\beta 1$, TS2/16, donde se observa la banda correspondiente a la subunidad común $\beta 1$ junto con las diferentes subunidades α asociadas.

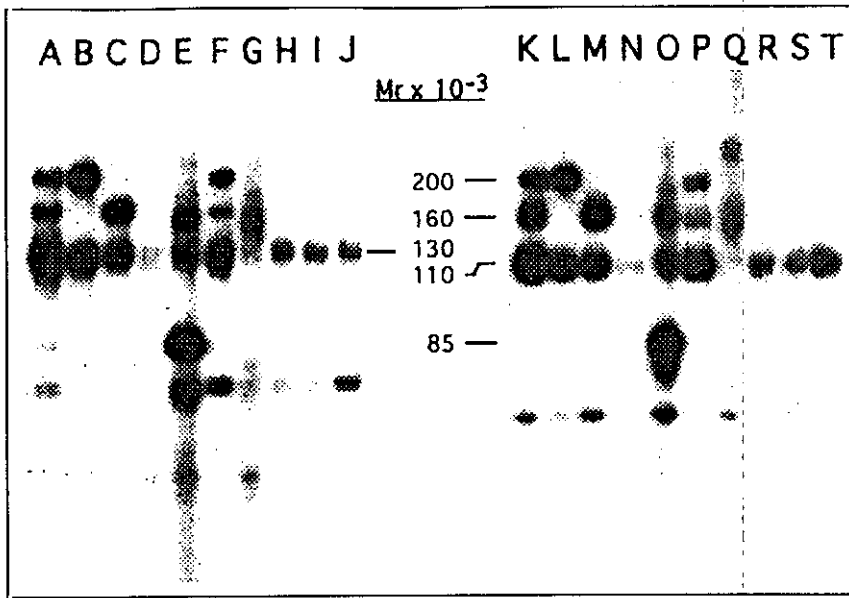


Figura 9A. Los AcMs HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21 inmunoprecipitan un único polipéptido con idéntica movilidad electroforética que la subunidad $\beta 1$. Linfoblastos T marcados con ^{125}I fueron lisados en PBS 1%TX100 sin cationes divalentes (Ca^{2+} Mg^{2+}) y la inmunoprecipitación se llevó a cabo según se describe en materiales y métodos utilizando los siguientes AcMs: TS2/16 ($\beta 1$), calles A y K; TS2/7 (VLA-1), calles B y L; Teal/41 (VLA-2), calles C y M; P1B5 (VLA-3), calles D y N; HP2/1 (VLA-4), calles E y O; Lia 1/2 ($\beta 1$), calles F y P; GoH3 (VLA-6), calles G y Q; HUTS-4, calles H y R; HUTS-7, calles I y S; y HUTS-21, calles J y T.

4.3.2.2.2. Efecto del Mn^{2+} en los precipitados de los AcMs
HUTS.

HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21 inmunoprecipita subunidades α asociadas a la subunidad $\beta 1$ en presencia de Mn^{2+} (activación de integrinas).

Los epítomos reconocidos por los AcMs HUTS se expresan en condiciones determinadas de cationes divalentes (citometría de flujo), coincidiendo con la activación de las integrinas; por lo que decidimos realizar el proceso de inmunoprecipitación en presencia de concentraciones fijas de cationes divalentes para observar el nuevo patrón del inmunoprecipitado de los AcMs HUTS. Alicuotas del lisado de linfoblastos T marcados radiativamente con I^{125} se preincubaron con concentraciones fijas de cationes divalentes, manteniéndola posteriormente durante todo el proceso (materiales y métodos). Cuando el proceso de inmunoprecipitación se realizó en condiciones que representan la inactividad de las

integrinas, esto es en ausencia total de cationes divalentes utilizando el quelante EDTA (3mM), los AcMs HUTS inmunoprecipitaban una banda correspondiente a la subunidad $\beta 1$. En condiciones fisiológicas del estado de activación de las integrinas, equivalente a los cationes divalentes Ca^{2+} (1mM) + Mg^{2+} (1mM), los AcMs HUTS igualmente inmunoprecipitaban la banda correspondiente a $\beta 1$. Por el contrario la inmunoprecipitación en presencia de Mn^{2+} (2mM), correspondiente a un estado de activación de las integrinas, induce cambios importantes, tanto cualitativos como cuantitativos, en los inmunoprecipitados de los AcMs HUTS. El Mn^{2+} induce la aparición de bandas adicionales que coinciden con $\alpha 1$, $\alpha 2$ y el fragmento de 80 kDa de $\alpha 4$ asociadas a la subunidad $\beta 1$ común, que aparece con mayor intensidad. Se utilizó como control el AcM anti- $\beta 1$, TS2/16, que era invariable en todos los casos (fig. 9B).

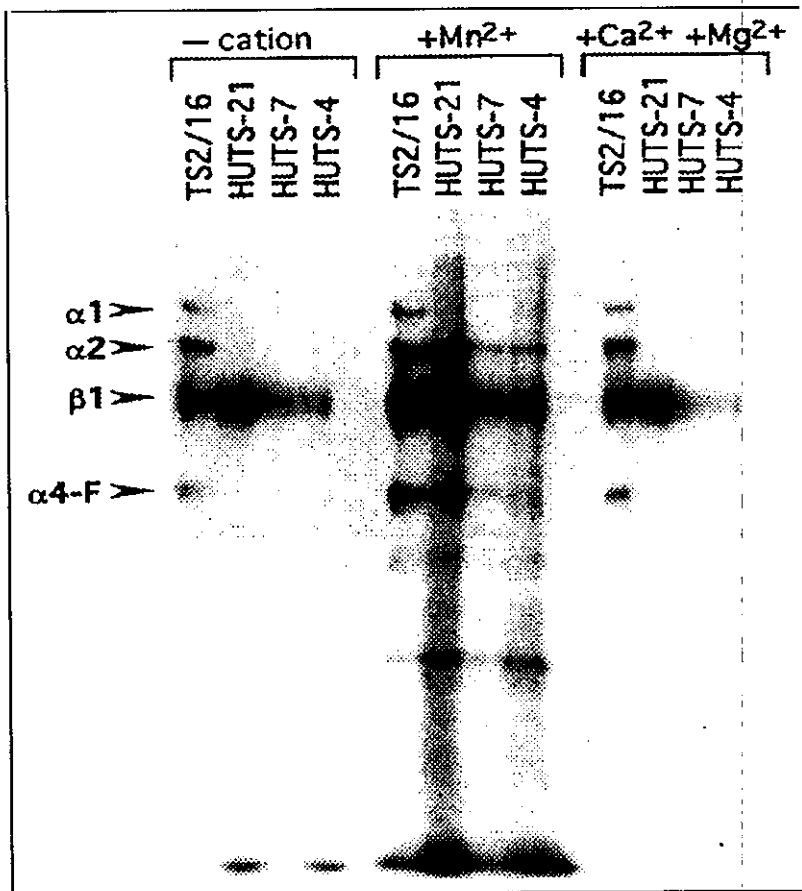


Figura 9B. La adición de Mn^{2+} a lisados de linfoblastos T induce la aparición de las subunidades α asociadas con la subunidad $\beta 1$ en los

inmunoprecipitados de los AcMs HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21. Los linfoblastos T marcados con ^{125}I fueron lisados en tampón Hepes con 1% de TX100 sin cationes divalentes. Posteriormente, a diferentes alícuotas del lisado se le añadieron distintas cantidades de los cationes divalentes Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} a una concentración final de 1mM. La inmunoprecipitación se realizó con los Acms anti- $\beta 1$ TS2/16 (control invariante en los inmunoprecipitados) y los AcMs HUTS.

4.3.2.2.3. Inmunoprecipitación en condiciones disociantes de los heterodímeros VLA.

La disociación del heterodímero VLA en sus subunidades α s y $\beta 1$ se realizó sometiendo a lisados de linfoblastos T marcados radiactivamente con I^{125} , en presencia de Mn^{2+} (1mM), a pH 11 durante 30 min a 37°C y una rápida neutralización a pH 8. Se utilizó la incubación de los lisados a pH 8 como control de que la disociación era correcta y no era un efecto de una posible degradación. Posteriormente se inmunoprecipita y se observa como en condiciones disociantes el AcM HUTS-21 solo reconoce la banda de $\beta 1$, mientras que en condiciones no disociantes precipita las mismas bandas comentadas en el punto anterior. El mismo efecto se observa con el AcM control TS/16 (**fig. 9C**). Similares resultados se obtuvieron para los AcMs HUTS-4 y HUTS-7.

Todos estos resultados demuestran que los AcMs HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21 reconocen un epítipo en la subunidad $\beta 1$ de las integrinas VLA dependiente de la presencia de determinados cationes divalentes, que se puede traducir en estados activados de las integrinas VLA.

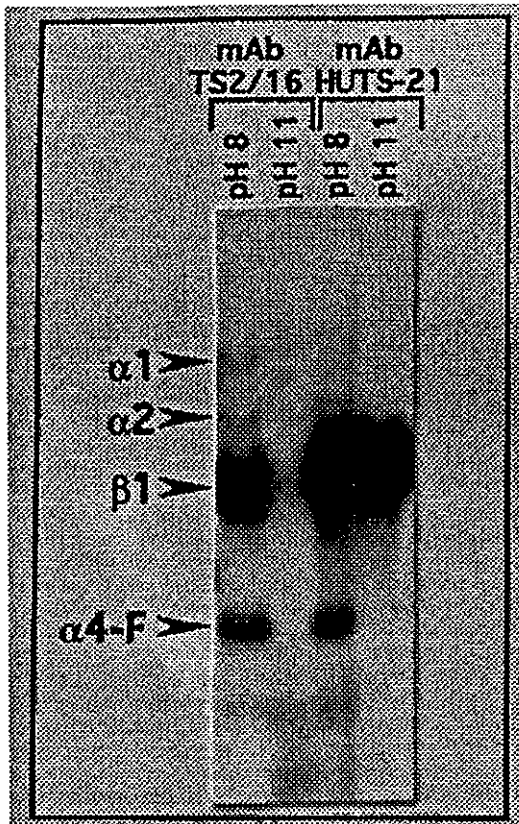


Figura 9C. El AcM HUTS-21 precipita el polipeptido $\beta 1$ a partir de un lisado de ^{125}I -linfoblastos T después de la disociación, por un tratamiento de alto pH, de los heterodímeros en sus subunidades α s y β 1. Linfoblastos T marcados con ^{125}I fueron lisados en 10 mM Tris, 1% TX100, 1m Mn^{2+} , pH 8. Alicuotas del lisado se trataron con un pH 11 para disociar las subunidades de integrinas y pH 8 como control del experimento. La inmunoprecipitación se realizó con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de los respectivos AcMs. Similares resultados se obtuvieron para los AcMs HUTS-4 y HUTS-7.

3.4. La activación de las integrinas $\beta 1$ en linfoblastos T inducen la expresión de los epítomos HUTS.

Los cambios en la expresión de los epítomos HUTS, en la subunidad $\beta 1$, en presencia de Mn^{2+} y Mg^{2+} puede representar que estos AcM reconocen epítomos reportadores de la activación funcional de las integrinas VLA. Con el fin de demostrar esta hipótesis, examinamos si la inducción de la activación de las integrinas VLA por otros estímulos también estaba acompañado por un aumento en la expresión de los epítomos HUTS. Los linfoblastos T se preincubaron con el AcM activador anti- $\beta 1$ TS2/16, el éster de

forbol 12,13-dibutirato o PdBu y el ionóforo de calcio A23187 en el tampón Hepes con 1mM de Ca^{2+} y 1mM de Mg^{2+} (condiciones fisiológicas) durante 30 min a 37°C. Posteriormente se analizaba la expresión de los epítomos HUTS, empleando el correspondiente AcM biotinilado, por técnicas de citometría de flujo (materiales y métodos). La **fig. 10** muestra como en todos los casos en los que se ha inducido la activación de integrinas $\beta 1$, también se ha aumentado la expresión del epítopo HUTS-21. Se obtuvieron idénticos resultados para los AcMs HUTS-4 y HUTS-7. Estos resultados confirman que la expresión de los epítomos reconocidos por los AcMs HUTS están en relación directa con la activación de las integrinas VLA.

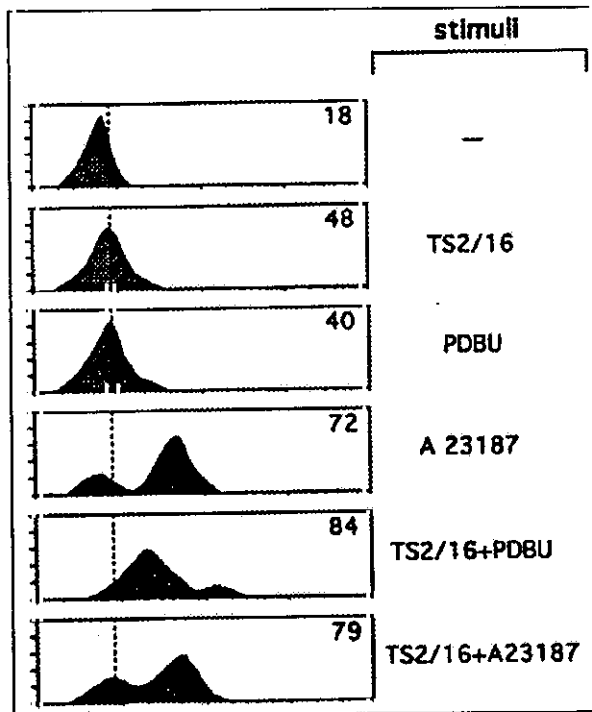


Figura 10. La preincubación de linfoblastos T con el AcM estimulador anti- $\beta 1$ TS2/16, éster de forbol PdBu y el ionóforo de calcio A23187 induce un aumento en la expresión del epítopo reconocido por el AcM HUTS-21. Los linfoblastos T se preincubaron con el AcM TS2/16 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), el éster de forbol 12,13-dibutirato o PDBU (100nM) o el ionóforo de calcio A23187 (2 μM) en el tampón Hepes con 1mM de Ca^{2+} y 1mM de Mg^{2+} (condiciones fisiológicas) durante 30 min. a 37°C. Posteriormente se añadió el AcM HUTS-21 biotinilado durante otros 10 min y la unión se detectó con avidina fluoresceínada (materiales y métodos). Los números representan el porcentaje de células positivas. Se obtuvieron idénticos resultados para los AcMs HUTS-4 y HUTS-7.

4.3.4. Correlación funcional entre los niveles de expresión de los epítomos HUTS y el grado de activación de las integrinas $\beta 1$.

Con el objetivo de caracterizar el paralelismo existente entre activación de las integrinas VLA y la expresión de los epítomos HUTS, decidimos hacer un análisis detallado de la expresión de estos epítomos en varias condiciones de cationes divalentes y de temperatura, y correlacionarlos con ensayos funcionales de adhesión celular a ligandos para integrinas VLA. A temperatura fisiológica (37°C) y en condiciones de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ había una mínima expresión de los epítomos HUTS, la cual se revertía totalmente cuando estaba únicamente presente Ca^{2+} . En condiciones de activación de las integrinas, que correspondía con la incubación de los linfoblastos T con $\text{Mg}^{2+} + \text{EGTA}$ (quelante de Ca^{2+}) o Mn^{2+} , la expresión de los epítomos HUTS se incrementaban considerablemente. Cuando todos estos estudios se realizaron a 4°C , temperatura que no permite la activación de las integrinas, la expresión basal de estos epítomos era negativa, e incluso en el intento de activación de las integrinas en presencia de Mn^{2+} daba unos insignificantes niveles de expresión de los epítomos HUTS. Como control de la expresión invariable de las integrinas $\beta 1$ utilizamos el AcM TS2/16 (fig. 11A).

En la fig. 11B se muestran los resultados obtenidos en ensayos de adhesión de linfoblastos T, realizados a temperatura fisiológica y en diferentes condiciones de cationes divalentes, a ligandos para VLA: colágeno de tipo I, laminina y fibronectina. Se observa, bajo todas las condiciones de cationes utilizadas, una correlación directa entre los niveles de expresión de los epítomos HUTS (fig. 11A) y el grado de activación funcional de las integrinas VLA, medida como porcentaje de adhesión celular a los diferentes ligandos testados.

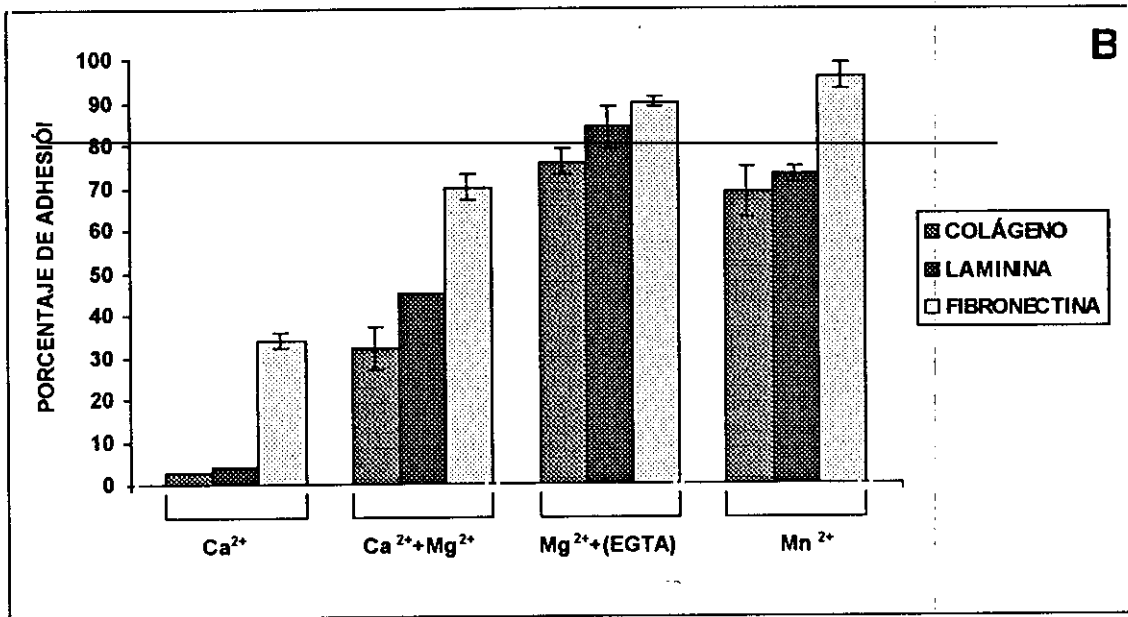


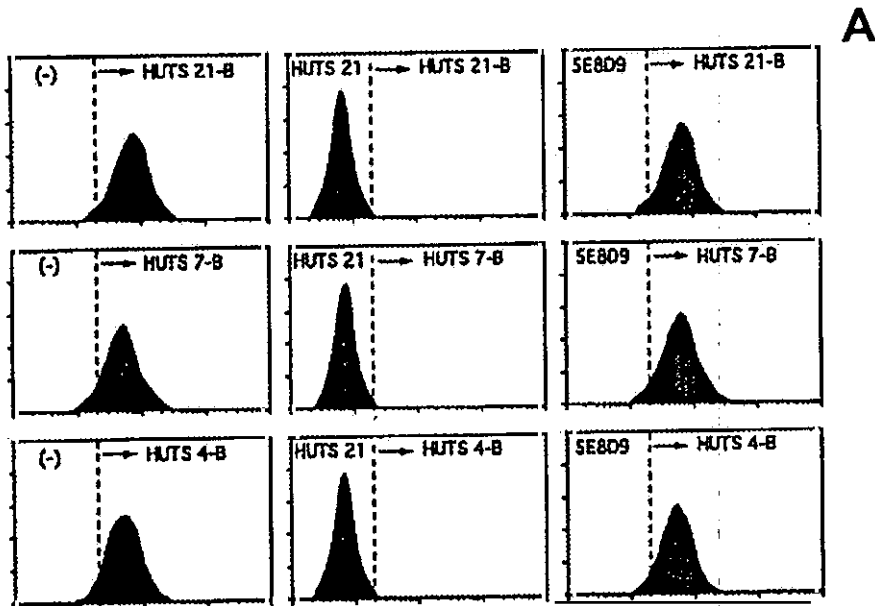
Figura 11. Regulación por cationes divalentes de la expresión de los epitopos reconocidos por los AcMs HUTS y de la adhesión mediada por integrinas $\beta 1$ de linfoblastos T. **A)** La expresión de los epitopos de la subunidad $\beta 1$ HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21 es inducida a 37°C por Mg^{2+} o Mn^{2+} y es inhibida por la presencia de Ca^{2+} y/o bajas temperaturas. **B)** Adhesión de linfoblastos T a ligandos específicos de las integrinas $\beta 1$ colágeno de tipo I, laminina y fibronectina a 37°C en diferentes condiciones de cationes divalentes a las siguientes concentraciones: 1mM Ca^{2+} , 1mM Mg^{2+} , 0.5mM Mn^{2+} , 2mM EGTA.

4.3.5. Los AcMs HUTS reconocen epitopos solapantes situados entre los residuos 355-425 de la subunidad $\beta 1$.

Para averiguar la localización física de los epitopos reconocidos por los AcMs HUTS realizamos, mediante técnicas de citometría de flujo, ensayos de competición cruzada de epitopos que consistían en una incubación previa de los linfoblastos T con un AcM purificado y posteriormente la incubación con el AcM biotinilado que se quería testar (materiales y métodos). En la **fig. 12A** se muestra los perfiles de citometría de flujo donde se ve la

expresión de los epítomos reconocidos por los AcM HUTS-biotinilados en estas condiciones y se mantienen en presencia de la preincubación con el AcM control anti-VLA-1 5E8D9. Pero la expresión de los AcMs HUTS-biotinilados es drásticamente inhibida cuando se preincuba con el purificado del AcM HUTS-21. Similares resultados se obtuvieron bloqueando con los otros AcMs HUTS. Con lo cual queda demostrado que los tres AcMs HUTS reconocen el mismo epítomo o epítomos solapantes en la subunidad $\beta 1$.

En colaboración con el Dr. Takada y mediante técnicas de Western-Blot usando un panel de moléculas quiméricas $\beta 1$ humano/ratón purificadas, demostramos que el AcM HUTS-21 reconoce una banda correspondiente a los residuos 1-425 de la cadena $\beta 1$ humana, pero no la banda que incluye los residuos humanos 1-354, por lo que confirmamos que los Acms HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21 reconocen epítomos localizados en una región entre los residuos 355-425 de la subunidad $\beta 1$ (fig. 12B). Con estos datos describimos una nueva región reguladora de la activación de las integrinas VLA, dentro de la subunidad $\beta 1$, ya que hasta ahora todos los Acms con funciones reguladoras $\beta 1$ -específicos reconocían una región entre los residuos 207-218, como el AcM TS2/16.



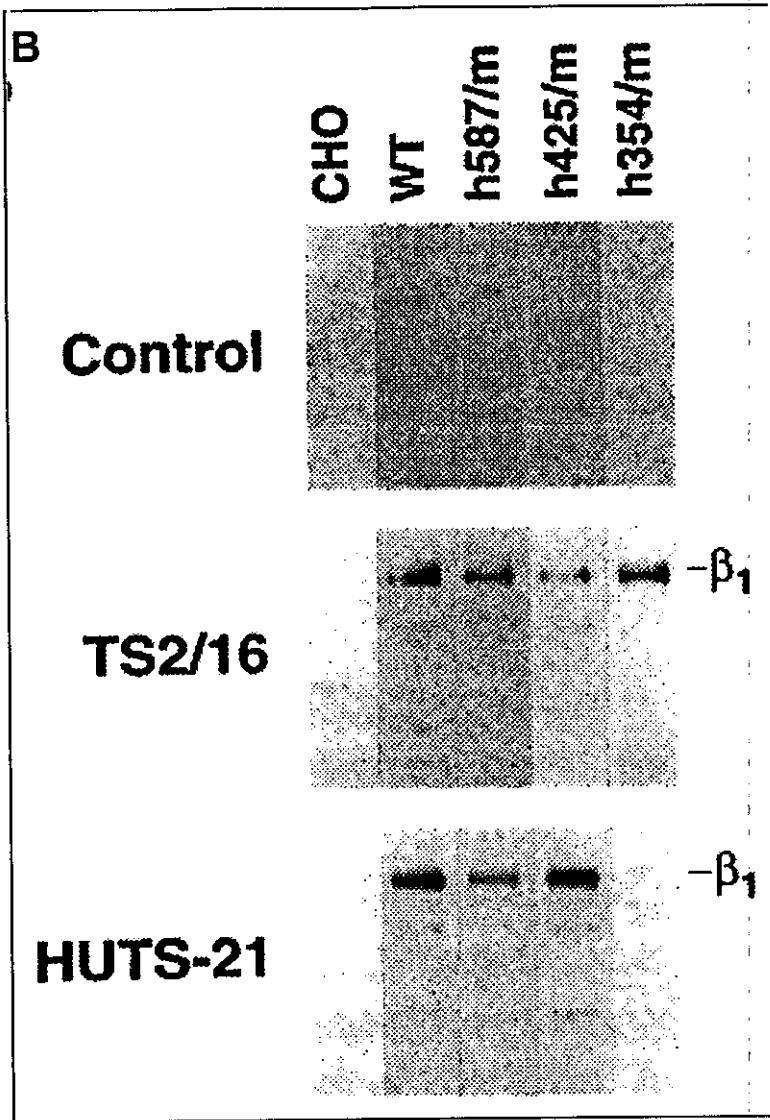


Figura 12. A) Los AcMs HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21 compiten por el sitio de union en la subunidad β_1 de las integrinas VLA. En cada muestra, los linfoblastos T primeramente se incubaban con el AcM mostrado en el lado izquierdo de las flechas y posteriormente con el AcM biotinilado mostrado a la derecha de las flechas. El anti-VLA-1 (CD49a) 5E8D9 se usó como control. B) el epítipo reconocido por el AcM HUTS-21 se encuentra entre los residuos 354-425 de la subunidad β_1 humana. Moleculas β_1 humanas y quiméricas entre humano/raton h587/r, h425/r y h354/r fueron inmunoprecipitadas y separadas por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y transferidas a una membrana de Immobilon P, a partir de la cual se realizó Western-Blot con los AcMs HUTS-21 y TS2/16. Los AcMs HUTS-4 y HUTS-7 dieron resultados idénticos.

4.3.6. Los epítomos HUTS se comportan como LIBS.

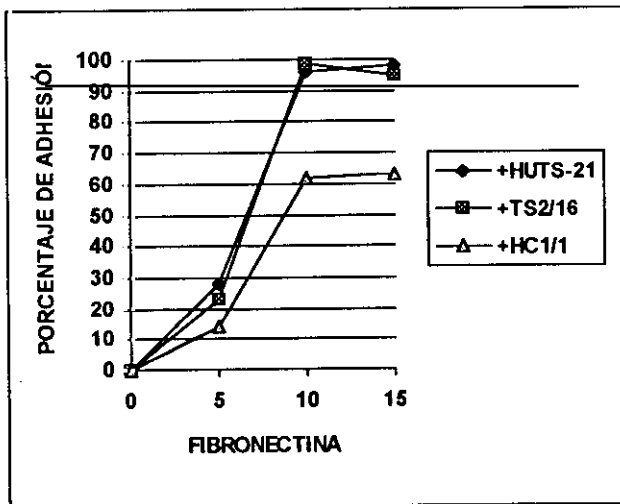
Los epítomos reconocidos por los AcMs HUTS se comportan *LIBS* (ligand induced binding sites), son iniciales en inglés que significan que la expresión de los epítomos es inducida por la unión del ligando específico a los correspondientes miembros de las integrinas VLA. En la **tabla 2** se muestra como la preincubación de linfoblastos T y K562 con ligandos para determinados miembros de la subfamilia de las integrinas VLA, inducen un aumento de la expresión del epítomo HUTS-21, demostrando su comportamiento como *LIBS*.

AcMs	Linfoblastos T		Eritroleucémica (K562)	
	% células positivas	Int.media fluoresc.	% células positivas	Int.media fluoresc.
X63	2.4	27.7	3.1	7.7
TS2/16	60.4	82.3	94.5	72.7
HUTS-21	2.3	7.2	41.9	25.3
HUTS-21 + ...				
BSA (40)	1.8	6.1	48.8	29.2
VCAM-1 (25)	30.7	19.0	44.2	26.7
Fn 80 (50)	13.4	10.2	85.1	54.8
Fntotal(40)	1.5	6.2	44.7	31.7
Mn ²⁺ (0.5mM)	36.8	25.22	69.3	40.9

Tabla 2. La expresión del epítomo $\beta 1$ reconocido por el AcM HUTS-21 es inducido en linfoblastos T y la línea celular K562 por la unión de los ligandos solubles FN 80 y VCAM-1. Los linfoblastos T expresan receptores en su superficie para FN 80 (VLA-5) y VCAM-1 (VLA-4), por lo que la incubación con éstos inducen la expresión de los epítomos HUTS. La línea celular K562 solo expresa el heterodímero VLA-5, por lo que solo en el caso de incubación con FN 80 se va a potenciar la expresión de los epítomos HUTS. La incubación de los dos tipos celulares con FN total no va a inducir la expresión de los epítomos HUTS, probablemente por que los receptores tienen poca afinidad por este ligando. Los números entre paréntesis indican la concentración utilizada de los ligandos en $\mu\text{g/ml}$.

4.3.7. Los AcMs HUTS inducen activación funcional de las integrinas $\beta 1$.

Nos planteamos la cuestión si los AcMs HUTS eran capaces de ejercer algún efecto en la funcionalidad de las integrinas $\beta 1$. Para responder a esta cuestión, decidimos realizar ensayos de adhesión de linfoblastos T a ligandos para las integrinas VLA: colágeno de tipo I, fibronectina y laminina, en medio RPMI y en presencia de los respectivos AcMs. La **fig. 14** muestra como el AcM HUTS-21 induce un significativo aumento de la adhesión celular a los ligandos testados en la misma proporción que lo hace el AcM estimulador anti- $\beta 1$ TS2/16. Estos resultados demuestran que bajo condiciones "permisivas" para la adhesión celular mediada por integrinas $\beta 1$, los AcMs HUTS son capaces de inducir la activación funcional de las integrinas.



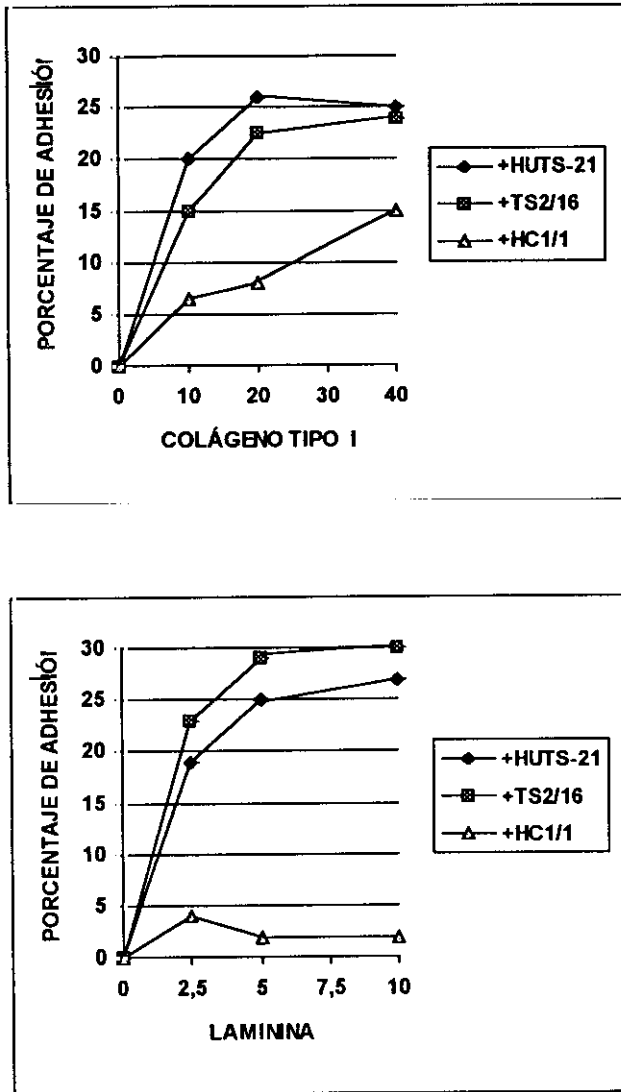


Figura 14. El AcM HUTS-21 estimula la adhesión de linfoblastos T a los ligandos específicos para integrinas $\beta 1$ colágeno de tipo I, fibronectina y laminina. Los ensayos de adhesión se desarrollaron en medio RPMI como se describe en materiales y métodos. Los AcMs se usaron a una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$. El AcM estimulador anti- $\beta 1$ TS2/16 y el AcM irrelevante anti CD11c HC1/1 se usaron como control. Resultados similares se obtuvieron con los AcMs HUTS-4 y HUTS-7.

4.3.8. La activación de las integrinas $\beta 1$ en todos los sistemas celulares viene representado por un incremento en la expresión de los epítomos HUTS.

Decidimos analizar la expresión de los epítomos HUTS en varios sistemas celulares para demostrar que la inducción en la expresión de estos epítomos durante el proceso de activación de las

integrinas $\beta 1$ es un efecto general que ocurre en todos los sistemas celulares y no es un fenómeno restringido del sistema celular elegido o una consecuencia de su cultivo y estimulación *in vitro* con fitohemoaglutinina/interleuquina-2. Estudiamos linfocitos frescos aislados de sangre periférica, así como las siguientes líneas celulares: linfoblastoide B RAMOS (solo expresa el miembro VLA-4 de las integrinas $\beta 1$), eritroleucémica K562 (expresa el miembro VLA-5), carcinoma de colon COLO-320 (expresan los miembros VLA-1, VLA-2, VLA-3, VLA-5 y VLA-6) y la línea celular mielomonocítica U-937. En todos estos sistemas celulares se observa un aumento en la expresión del epítipo HUTS-21, similar a lo descrito para linfoblastos T, en una situación de aumento de la activación de las integrinas $\beta 1$ inducida por la presencia del catión divalente Mn^{2+} a temperaturas fisiológicas, con respecto a la condición basal en presencia de $Ca^{2+} + Mg^{2+}$. Por el contrario, en la línea celular linfoblastoide B, JY, que no expresa niveles detectables de integrinas $\beta 1$, el Mn^{2+} no indujo la expresión de este epítipo (tabla 3). Se obtuvieron resultados similares para los AcMs HUTS-4 y HUTS-7.

	Linfocitos aislados de sangre periférica		Linfoblastoide B (RAMOS)		Eritroleucémica (K562)	
AcMs	$Ca^{2+} + Mg^{2+}$	Mn^{2+}	$Ca^{2+} + Mg^{2+}$	Mn^{2+}	$Ca^{2+} + Mg^{2+}$	Mn^{2+}
4°C						
X63	5.8	5.8	4.7	6.2	8.5	7.7
TS2/16	235.0	226.7	48.2	50.0	42.0	43.8
HUTS-21	14.8	26.4	7.7	11.0	16.2	18.4
37°C						
X63	5.4	4.8	5.9	6.1	8.0	7.6
TS2/16	228.7	236.9	56.7	53.7	47.8	47.4
HUTS-21	17.7	149.2	12.9	29.1	18.4	39.9

	Mielomonocítica (U-937)		Colocarcinoma (COLO 320)		Linfoblastoide B (JY)	
AcMs	Ca ²⁺ + Mg ²⁺	Mn ²⁺	Ca ²⁺ + Mg ²⁺	Mn ²⁺	Ca ²⁺ + Mg ²⁺	Mn ²⁺
4°C						
X63	13.5	12.0	9.2	8.9	5.5	5.7
TS2/16	330.0	315.7	187.0	190.3	10.5	10.9
HUTS-21	20.6	35.6	18.0	24.8	5.4	6.9
37°C						
X63	14.0	13.6	10.1	8.9	4.4	5.5
TS2/16	326.7	305.4	201.8	223.6	10.5	10.3
HUTS-21	49.0	60.9	20.7	184.8	5.3	7.3

Tabla 3. Expresión del epítipo HUTS-21 en distintos tipos celulares bajo diferentes condiciones de temperatura y cationes divalentes. El experimento se desarrolló en tampón Hepes con los correspondientes cationes divalentes en las condiciones que se explican en materiales y métodos. La concentración de los cationes divalentes era de 1mM para Ca²⁺ y Mg²⁺, y 0.5 mM de Mn²⁺. Los AcM se utilizaron a una concentración de 5 µg/ml usando X63 y TS2/16 como control negativo y positivo respectivamente. Los resultados están expresados como intensidad media de fluorescencia.

4.3.9. El grado de activación basal de las integrinas VLA depende del tipo celular y viene representado por la expresión de los epítopos HUTS.

Las integrinas VLA van a presentar distintos grados de activación en estado de reposo. El grado de activación de las integrinas VLA sobre los distintos sistemas celulares se puede precisar analizando la expresión de los epítopos reportadores de activación en la subunidad β1: HUTS. Se mantenía que las integrinas VLA se encontraban, en condiciones basales, en un estado poco activo o prácticamente inactivo, pero al realizar análisis de la expresión de los epítopos HUTS, vimos como diferentes tipos celulares expresan distintos niveles de los epítopos HUTS. Esto correspondería a que distintos sistemas celulares presentan diferentes grado de activación de las integrinas β1. En la **tabla 4** se muestra la expresión del epítipo HUTS-21 en los distintos sistemas celulares analizados: se observa como en condiciones basales la expresión de los epítopos HUTS es dependiente del

sistema celular y como la potenciación de la activación de las integrinas VLA utilizando el ión Mn^{2+} aumenta la expresión del epítipo. En la **fig. 15** se muestran ensayos de adhesión celular al ligando para integrinas VLA, FN, representativos donde se muestra la correlación funcional entre la expresión de los epítipos HUTS y nivel de adhesión celular basal. La presencia del AcM HUTS-21 es capaz de inducir la adhesión celular, como se muestra anteriormente con los linfoblastos T.

AcMs	Linfoblastos T		Eritroleucémica (K562)		Mielomonocítica (U937)	
	% células positivas	Int.media fluoresc.	% células positivas	Int.media fluoresc.	% células positivas	Int.media fluoresc.
X63	2.2	12.0	1.3	6.2	5.7	14.6
TS2/16	99.6	176.3	100.6	94.8	100.6	326.8
HUTS-21	11.5	20.3	35.0	18.3	82.2	49.1
HUTS-21+ Mn^{2+}	82.9	59.2	48.6	28.5	93.6	65.3

Tabla 4. Expresión del epítipo HUTS-21 en linfoblastos T y las líneas celulares K562 y U-937. El experimento se realizó en RPMI +/- 0.5mM de Mn^{2+} (materiales y métodos). Los AcMs se utilizaron a una concentración final de 5 μ g/ml.

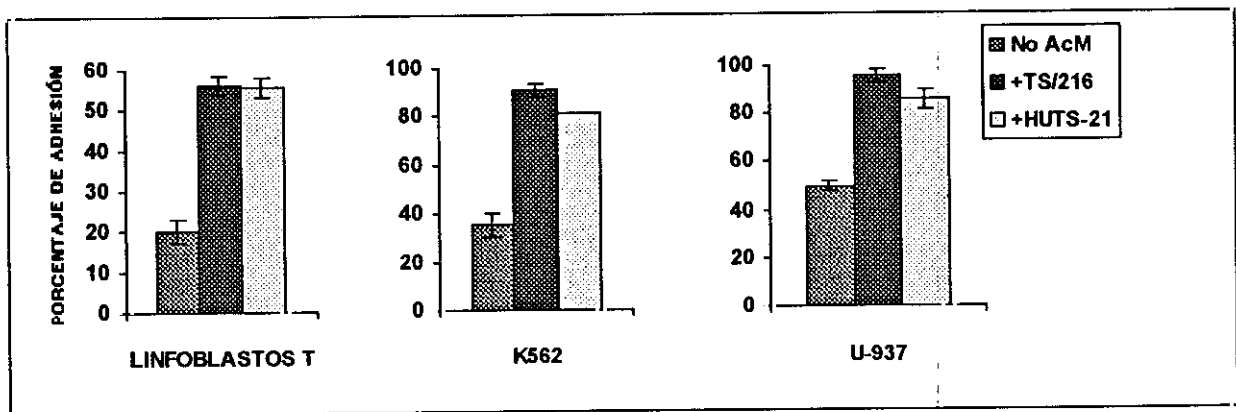


Figura 15. Distintos sistemas celulares presentan distinta capacidad de adherirse basalmente a fibronectina. Los ensayos de adhesión celular de linfoblastos T y las líneas celulares K562 y U-937 a fibronectina (7.5 μ g/ml) se desarrollaron en RPMI junto con los respectivos AcMs a una concentración de 5 μ g/ml según se describe en materiales y métodos. El AcM HUTS-21 induce adhesión celular en los sistemas testados. Resultados similares se obtuvieron para los AcMs HUTS-4 y HUTS-7.

Hay dos posibles explicaciones para interpretar la diferente expresión basal de los epítomos HUTS en los distintos sistemas celulares analizados y por consiguiente el grado de activación de las integrinas VLA. En primer lugar, las propias características de las células: su procedencia y el estado de activación general de las mismas van a determinar la activación basal de las integrinas VLA y por lo tanto la expresión de los epítomos HUTS. En segundo lugar, la expresión de los epítomos HUTS puede ser debida al comportamiento de estos epítomos como *LIBS*, esto es, que miembros de las integrinas $\beta 1$ situados sobre la superficie celular estén uniendo sus correspondientes ligandos de forma soluble. En la **tabla 5** se muestra que al menos para el caso de la línea celular K562 se puede afirmar que la expresión basal del epítomo HUTS-21 es debida a la unión de fibronectina, como se demuestra por la tinción con un AcM anti-fibronectina y por ensayo de citometría de flujo. En el caso de la línea celular U-937, la expresión basal del epítomo HUTS-21 puede ser debido por un lado a las características de este tipo celular o a la unión de otro tipo de ligando que no sea la fibronectina que no pudimos determinar al no poseer AcMs frente a otros ligandos para integrinas $\beta 1$.

	Linfoblastos T		Eritroleucémica (K562)		Mielomonocítica (U937)	
AcMs	% células positivas	Int.media fluoresc.	% células positivas	Int.media fluoresc.	% células positivas	Int.media fluoresc.
X63	6.6	15.5	3.5	15.5	3.9	17.3
TS2/16	100.0	523.2	100.0	219.6	100.0	898.4
HUTS-21	14.5	18.3	57.9	38.2	97.8	74.8
anti-Fn	8.5	15.8	46.6	33.0	18.9	22.2

Tabla 5. La expresión del epítomo HUTS-21 puede ser debida a la presencia de fibronectina sobre la superficie en algunos sistemas celulares. Estos ensayos se realizaron, por técnicas de citometría de flujo, en RPMI en presencia de los respectivos AcMs como se describe en materiales y métodos.

4.3.10. Modulación de la afinidad de las integrinas $\beta 1$ por los ésteres de forbol.

Los ésteres de forbol inducen un aumento en la adhesión celular mediada por integrinas VLA (Fig. 18). Para discernir si este incremento en la adhesión celular es debido a *spreading* celular (avidez) o por un aumento en la afinidad de las integrinas por el ligando decidimos realizar los siguientes experimentos.

4.3.10.1. Expresión de los epítomos HUTS.

Hemos investigado como afecta la presencia de los ésteres de forbol a la afinidad de las integrinas $\beta 1$ analizando por técnicas de citometría de flujo la expresión del epítipo reportador de activación HUTS-21. Como ya comentamos al principio, en la caracterización del epítipo reconocido por los AcMs HUTS, el pretratamiento de linfoblastos T con ésteres de forbol (PdBu) induce un incremento en la expresión del epítipo HUTS-21 de una manera dosis-dependiente. Usando como control positivo de máxima expresión del epítipo HUTS-21 el estímulo Mn^{2+} (0.5mM), vemos que el tratamiento con PdBu alcanzan niveles similares a los obtenidos por el Mn^{2+} . Resultados similares encontramos para la línea celular U-937. Sorprendentemente observamos que el pretratamiento de la línea celular K562 con PdBu no modifica el grado de expresión del epítipo HUTS-21. Usando Mn^{2+} , como en el caso anterior, se muestra que las integrinas en esta línea celular se pueden activar por otros estímulos, pero en este caso la funcionalidad de las integrinas $\beta 1$ no son sensibles al tratamiento con ésteres de forbol (tabla 6). Para descartar la posibilidad de que el tiempo de incubación de estas líneas celulares con los ésteres de forbol podría ser insuficiente para algún tipo de respuesta en la expresión del epítipo HUTS-21, hicimos los experimentos con periodos de incubación más largos, hasta un máximo de 48 horas, y no encontramos ninguna variación en los niveles de expresión. Lo que se puede concluir que: dependiendo del sistema celular analizado, los ésteres de forbol pueden incrementar la activación

de las integrinas $\beta 1$ o lo que es lo mismo el grado de afinidad de las integrinas $\beta 1$ por sus ligandos, como se refleja por un aumento en la expresión de los epítomos HUTS. En otros sistemas celulares la presencia de los ésteres de forbol no afecta al grado de afinidad de las integrinas $\beta 1$.

AcMs	Linfoblastos T		Eritroleucémica (K562)		Mielomonocítica (U937)	
	% células positivas	Int.media fluoresc.	% células positivas	Int.media fluoresc.	% células positivas	Int.media fluoresc.
X63	2.2	12.0	1.3	6.2	5.7	14.6
TS2/16	99.6	176.3	100.0	94.8	100.0	326.8
HUTS-21	11.5	20.3	35.0	18.3	82.2	49.1
HUTS-21+Mn ²⁺	82.9	59.2	48.6	28.5	93.6	65.3
HUTS-21 +PdBu (nM)						
1	15.2	21.6	32.2	17.7	87.6	53.2
20	36.6	29.4	37.3	19.5	89.1	56.2
50	47.8	33.9	34.2	18.6	93.8	64.9

Tabla 6. La respuesta en la activación de las integrinas $\beta 1$ por el tratamiento con los ésteres de forbol depende del tipo celular analizado. La activación de las integrinas se midió por técnicas de citometría de flujo utilizando como sonda la expresión del epítomo HUTS-21 como se explica en materiales y métodos. Los AcMs se utilizaron a una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$.

4.3.10.2. Ensayos de unión de ligando soluble.

Hasta ahora hemos dicho que la expresión de los epítomos HUTS corresponde al estado de activación en el que se encuentran las integrinas VLA o lo que es lo mismo el grado de afinidad de las integrinas por sus ligandos. Para demostrar que la expresión de los epítomos HUTS se correlaciona con el grado de afinidad de las integrinas $\beta 1$ por sus ligandos, decidimos hacer ensayos de unión de fibronectina soluble marcada radiactivamente con I^{125} a sus receptores celulares (materiales y métodos). El estado basal de la afinidad de las integrinas se calculó incubando las células con concentraciones fijas de fibronectina marcada radiactivamente en el tampón de la reacción en presencia de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$. Como controles

positivos de aumento de la afinidad utilizamos el AcM activador anti- $\beta 1$ TS2/16 y el catión divalente Mn^{2+} (Arroyo y col. 1993). En todos los casos, excepto en la presencia de Mn^{2+} , la incubación con los estímulos se realizó en condiciones basales en presencia de $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ (fig. 16). Mediante los ensayos de unión de fibronectina soluble marcada radiactivamente a los distintos tipos celulares, demostramos que efectivamente en los sistemas celulares que el PdBu induce un aumento en la expresión de los epítomos HUTS, linfoblastos T y U-937, realmente está provocando un estado de alta afinidad de la integrina por el ligando. Por el contrario, en la línea celular K562, donde la expresión de los epítomos HUTS no se ve alterada por la presencia de ésteres de forbol, tampoco se ve afectada la afinidad de la integrina por el ligando (fig. 16).

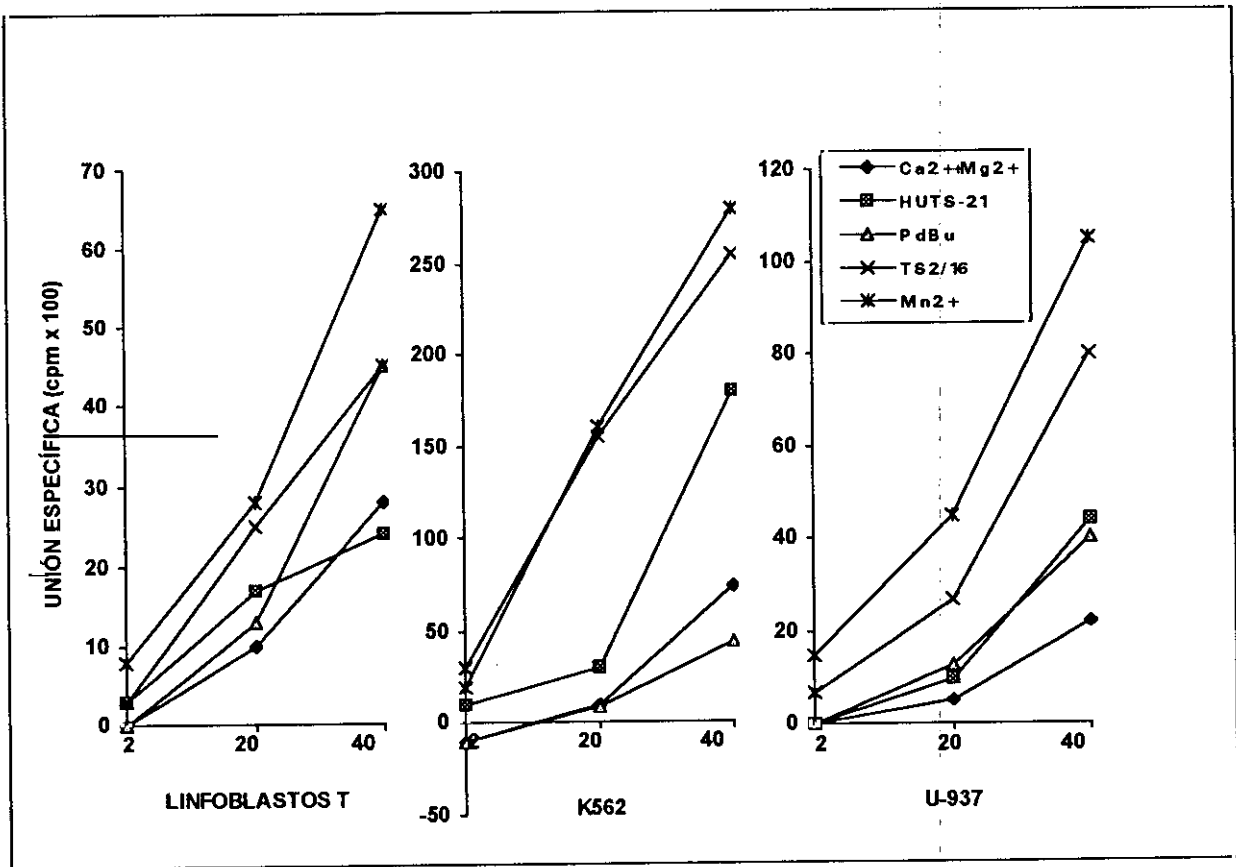


Figura 16. Ensayos de unión de ^{125}I -fibronectina soluble a linfoblastos T y las líneas celulares K562 y U-937. La unión específica del ligando soluble marcado radiactivamente a las respectivas células es el resultado de: la unión de ^{125}I -fibronectina menos la unión de la misma concentración de ^{125}I -fibronectina en presencia de diez veces de exceso de fibronectina sin marcar. U.E. = $FN^* - (FN^* + 10 \times FN)$. Los números de los ejes de abscisas representan la concentración de FN^* . Las incubaciones se

realizaron en el tampón de unión conteniendo las siguientes concentraciones de cationes divalentes y AcMs: 0.5 mM Ca^{2+} y 0.5 mM Mg^{2+} (rombos), 0.5 mM Ca^{2+} /0.5 mM Mg^{2+} + 5 $\mu\text{g/ml}$ del AcM TS2/16 (aspas), 0.5 mM Ca^{2+} /0.5 mM Mg^{2+} + 5 $\mu\text{g/ml}$ del AcM HUTS-21 (cuadrados), 0.5 mM Ca^{2+} /0.5 mM Mg^{2+} + 75 nM PdBu (triangulos) y 0.5 mM de Mn^{2+} (asteriscos).

4.3.11. Mecanismos de acción de los AcMs HUTS.

Los resultados anteriores demuestran que los AcMs HUTS inducen un aumento en la adhesión celular a ligandos para integrinas VLA similar al que produce el AcM TS2/16, y que distintos sistemas celulares expresan distintos niveles de los epítomos HUTS. Por todo esto se nos plantea la cuestión de averiguar cuales son los mecanismos por los que se está produciendo ese aumento en la adhesión celular inducido por los AcMs HUTS: pueden estar induciendo cambios conformacionales de las integrinas que lleve a un aumento en la afinidad por el ligando o puede ser debido a un proceso que ocurre posterior a la interacción integrina-ligando, como *spreading* celular, o también puede deberse a que los AcMs HUTS sean capaces de mantener "congelados" las conformaciones integrina-ligando que se encuentren interaccionando.

4.3.11.1. Ensayos de unión de ligando soluble.

Para intentar dar explicación a esta pregunta realizamos, en primer lugar, ensayos de unión de fibronectina soluble marcada radiactivamente con I^{125} en presencia del AcM HUTS-21. En los sistemas celulares que expresan basalmente el epítomo HUTS-21: K562 y U-937, la presencia del AcM HUTS-21 induce un aumento en la afinidad de las integrinas por el ligando, mientras que en el caso de linfoblastos T, que no hay expresión de los epítomos HUTS, no se observa variación de la afinidad en presencia del AcM HUTS-21. Para dar una posible explicación hay que tener en cuenta que las interacciones integrina-ligando son reversibles y que la expresión basal del epítomo HUTS-21 va a indicar el grado de activación de las integrinas VLA. En los sistemas celulares que presentan una expresión basal de los epítomos HUTS, U-937 y K562, van a favorecer la interacción integrina-ligando y la presencia del AcM HUTS-21

"congelaría" esa conformación de la interacción reversible desplazando el equilibrio hacia un aumento en la afinidad, siempre aparente, de la integrina por el ligando. En el caso de los sistemas celulares que presentan niveles bajos de HUTS-21 las interacciones integrina-ligando son mucho menos frecuentes, por lo que la presencia del AcM HUTS-21 prácticamente no afecta a la afinidad. Lo que se puede concluir que el aumento en la afinidad de la integrina por el ligando inducido por el AcM HUTS-21, es debido a la congelación de la conformación integrina-ligando llevando a un incremento en la afinidad "aparente" y no es debida a un cambio conformacional de la integrina inducido por el AcM HUTS, como muestra la falta de respuesta en la afinidad de las integrinas en presencia del AcM HUTS-21 en linfoblastos T (fig. 16).

4.3.11.2. Ensayo de adhesión celular preincubando con los respectivos AcMs.

Para intentar clarificar aún más el mecanismo por el cual los AcMs TS2/16 y HUTS-21 inducen aumento de adhesión celular, decidimos realizar ensayos de adhesión celular al ligando fibronectina de dos líneas celulares representantes de dos niveles de expresión basal del epítipo HUTS-21: linfoblastos T y U-937. Los ensayos de adhesión celular se realizaron de dos maneras: 1) como los descritos hasta ahora en materiales y métodos, osea el AcM estaba en presencia durante todo el experimento y 2) con una variante: preincubando las células con el correspondiente AcM durante 15 min/37°C, lavar el exceso de AcM y posteriormente llevarlas sobre los pocillos en los que se encontraba fijado el ligando y dejar que se desarrollase la adhesión. En la fig. 17 se muestran los resultados obtenidos. En los dos sistemas celulares, independientemente de la expresión de los epítopos HUTS, cuando los AcMs TS2/16 o HUTS-21 están presentes durante el experimento inducen un significativo aumento en la adhesión celular, coincidente con lo descrito hasta ahora. Pero cuando se realiza la preincubación de las células con los respectivos AcMs ocurre: el epítipo reconocido por el AcM TS2/16 esta presente en la subunidad $\beta 1$ de las integrinas en todas las condiciones, por lo que la

preincubación de las células con el AcM TS2/16 va a permitir que se una a su epítipo y posteriormente ejerza su función induciendo un cambio conformacional de las integrinas VLA a un estado de alta afinidad por el ligando que resulta en un aumento de la adhesión celular cuando se depositen sobre los pocillos recubiertos con ligandos específicos. Por el contrario en el caso del pretratamiento con el AcM HUTS-21 no ocurre lo mismo: la unión del AcM HUTS-21 a sus epítipos solo se realiza en esos casos que haya una expresión de los mismos. Por lo que solo en los casos que hay una considerable expresión del epítipo HUTS-21 (U-937), el AcM HUTS-21 se unirá al correspondiente epítipo con lo que será capaz de inducir aumento en la adhesión celular, similar al del AcM TS2/16, cuando se pongan las células en contacto con el sustrato. En los sistemas celulares con baja expresión de los epítipos HUTS no habrá unión del AcM y posteriormente no afectará a la adhesión celular.

Todos los resultados demuestran que el mecanismo por el cual ambos AcMs inducen adhesión celular es distinto: el AcM TS2/16 reconoce un epítipo que se expresa constitutivamente en las integrinas $\beta 1$ e induce un cambio conformacional que aumenta la afinidad de integrina-ligando. Mientras que la inducción de la adhesión celular por el AcM HUTS-21 va a ser más compleja: en general todos los resultados se acercan a la idea de que el AcM HUTS-21 va a mantener congelada las interacciones reversibles integrina-ligando que, aunque algunas veces sea con muy baja afinidad, se produce de forma espontánea. Como demostramos más adelante, el AcM HUTS-21, al igual que el AcM TS2/16 por sí mismo va a inducir un aumento en el *spreading* celular que favorece la adhesión celular.

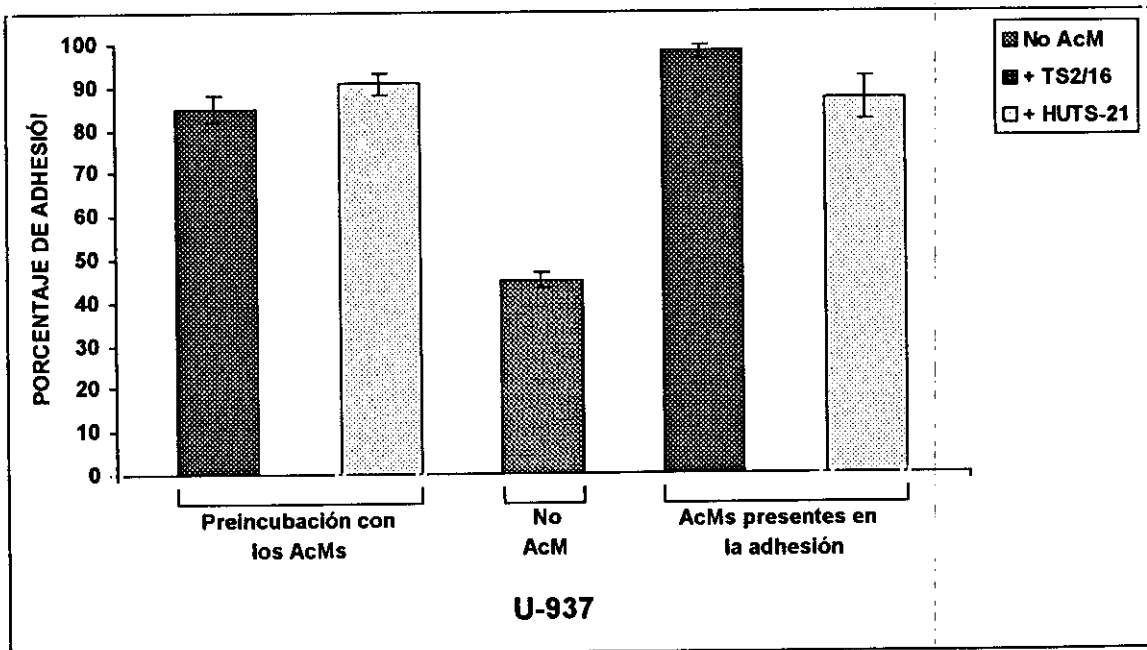
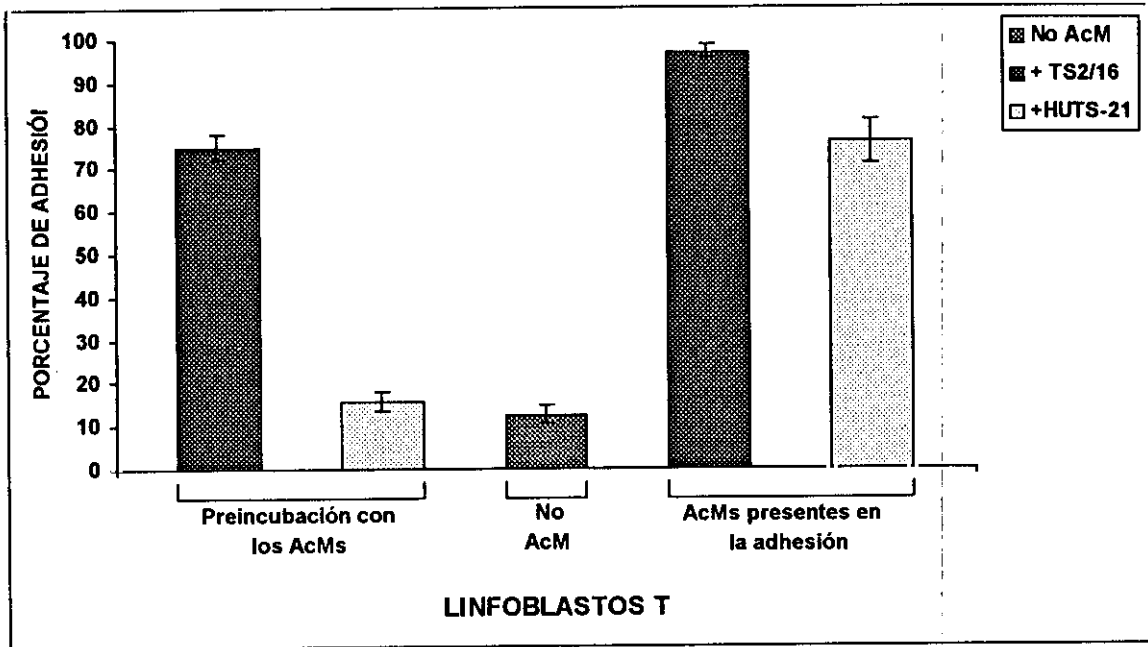
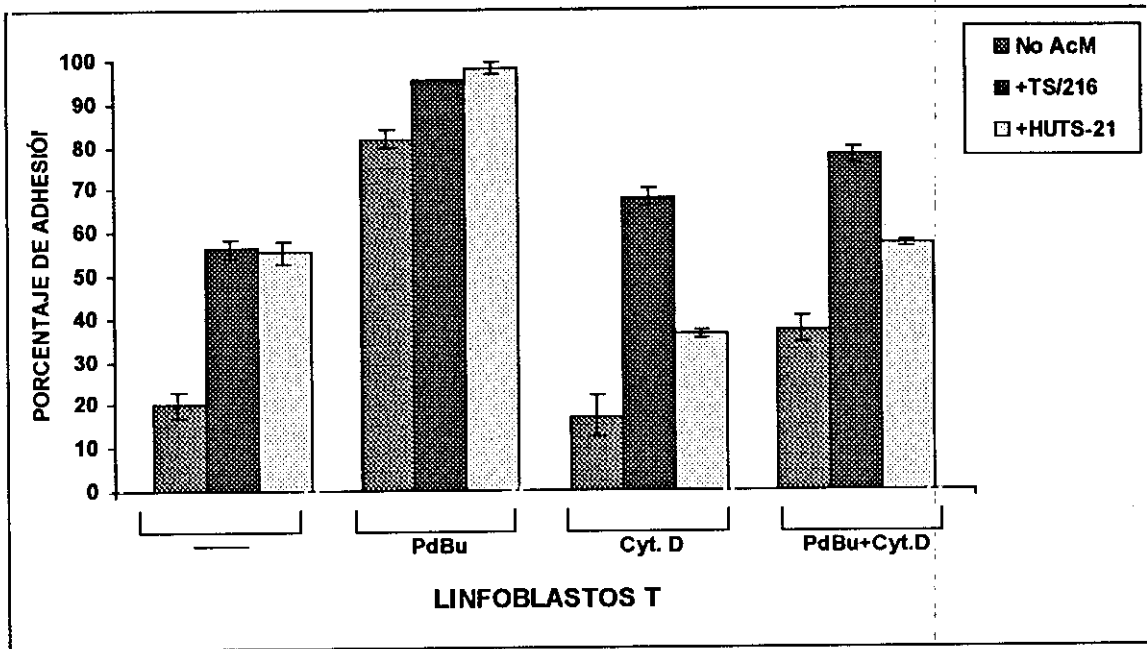


Figura 17. Comparación entre ensayos de adhesión en los que las células se preincubaban con los AcMs o los AcMs se mantenían en presencia durante todo el ensayo. Las células se preincubaban con los correspondientes AcMs durante 15 min a 37°C, luego se lava el exceso de AcM y se realiza el ensayo adhesión celular al ligando fibronectina (7.5 µg/ml) como se explica en materiales y métodos. Las muestras en las que los AcMs están presentes se realiza como hasta ahora se ha expuesto. El ensayo se realizó en RPMI con concentraciones finales de AcMs de 10 µg/ml.

4.3.12. Correlación funcional entre los distintos de afinidad de las integrinas VLA.

El resultado neto de la adhesión celular es una suma entre el grado de la afinidad de las integrinas por el ligando y la avidez o la probabilidad de interacción integrina-ligando, en este caso es muy importante el aplastamiento o *spreading* celular. Por último, hemos intentado correlacionar funcionalmente los resultados obtenidos en los ensayos de la afinidad de las integrinas $\beta 1$ por los distintos estímulos realizando ensayos de adhesión celular a fibronectina en presencia o ausencia del inhibidor de la polimerización del citoesqueleto de actina: citocalasina D (Cyt D). La Cyt D es un agente que va a inhibir el *spreading* celular por lo que es muy útil para intentar discernir a que se debe la adhesión celular, ya que en presencia de este inhibidor la adhesión celular únicamente va a ser debida a la afinidad de las integrinas por los respectivos ligandos. Como control positivo de aumento de la afinidad de las integrinas $\beta 1$ se usó el AcM TS2/16, que incrementó la adhesión celular a la fibronectina inmovilizada en todos los caso del experimento. Como hemos descrito anteriormente el AcM HUTS-21 induce un aumento en la adhesión celular a fibronectina en los mismos niveles que el TS2/16. Por ensayos de afinidad, en linfoblastos T el AcM HUTS-21 por sí mismo no inducía un estado de alta afinidad de las integrinas $\beta 1$ por la fibronectina, por lo que cuando se realizaban los experimentos en presencia de Cyt D, las células no se permitían que se aplanasen y la probabilidad de interacción integrina-ligando es mucho menor resultando en niveles de adhesión basales. En K562 y U-937 el AcM HUTS-21 inducía un aumento en la afinidad "aparente" de la integrina por su ligando, lo que se refleja en un aumento en la adhesión celular incluso en presencia de Cyt D. En el caso de la presencia de PdBu ocurría algo parecido: el PdBu por sí mismo inducía un aumento considerable de adhesión celular en todos los sistemas analizados. Esta descrito que los ésteres de forbol inducen *spreading* celular. En los casos de linfoblastos T y de U-937, donde PdBu inducía incremento de la afinidad de las integrinas, la combinación de PdBu + Cyt D resulta

en una adhesión notablemente mayor que la basal. Pero en el caso de línea celular K562, donde el PdBu no inducía incremento en la afinidad, la adhesión a fibronectina en presencia de PdBu + Cyt D resulta en niveles basales de adhesión celular (**fig. 18**).



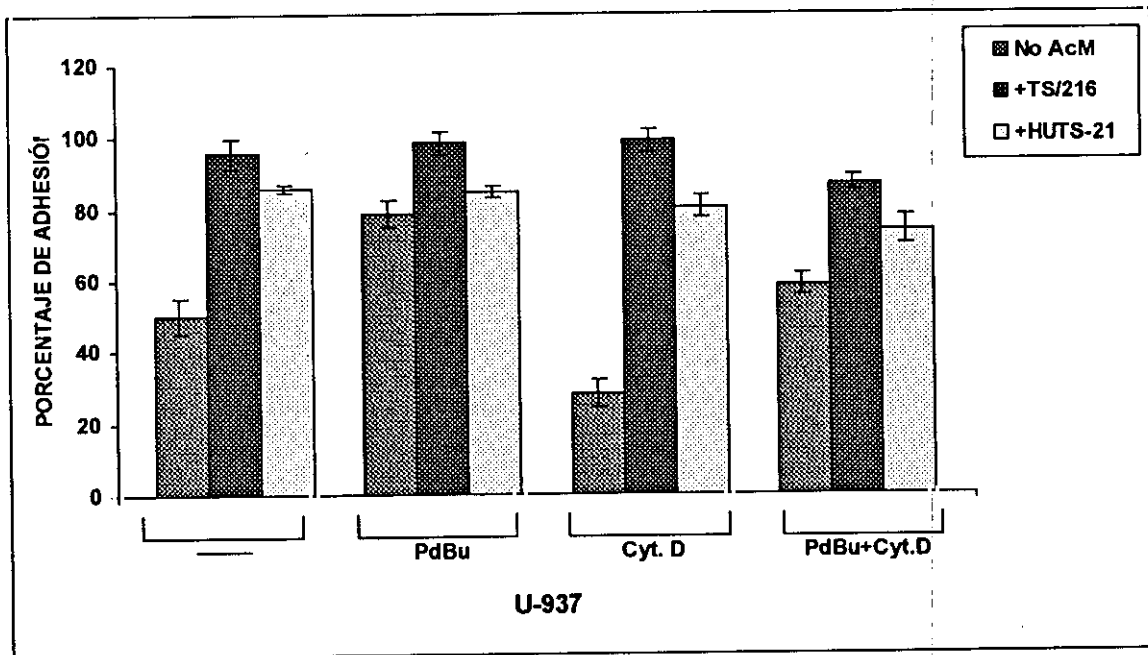
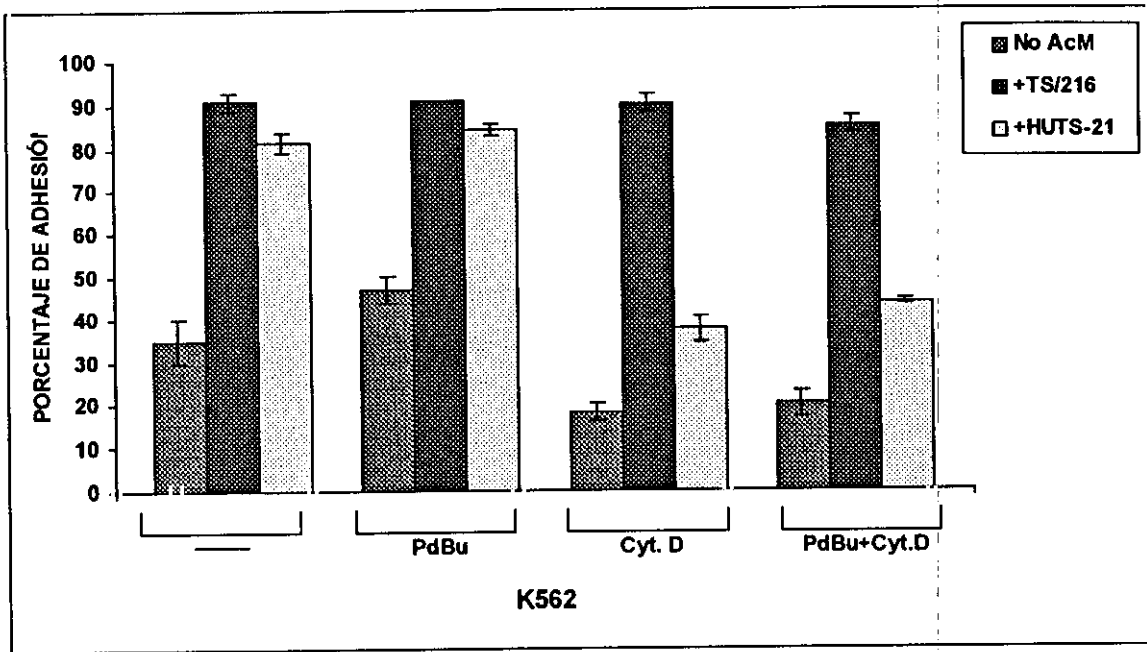
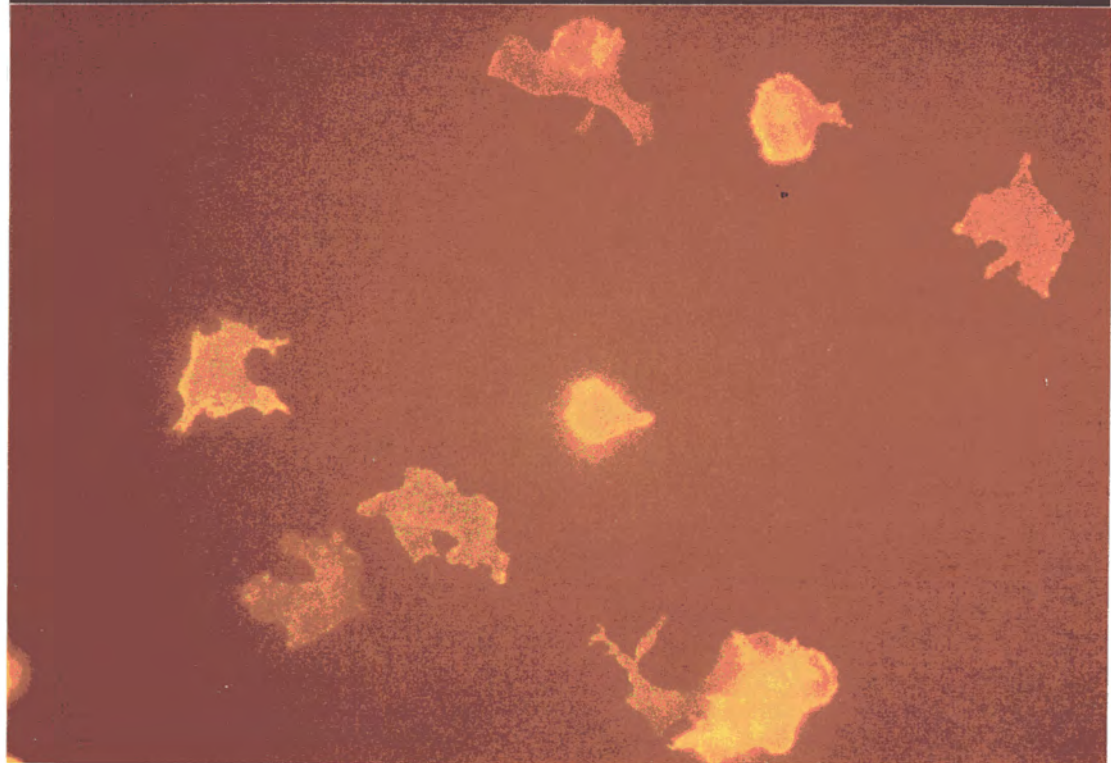
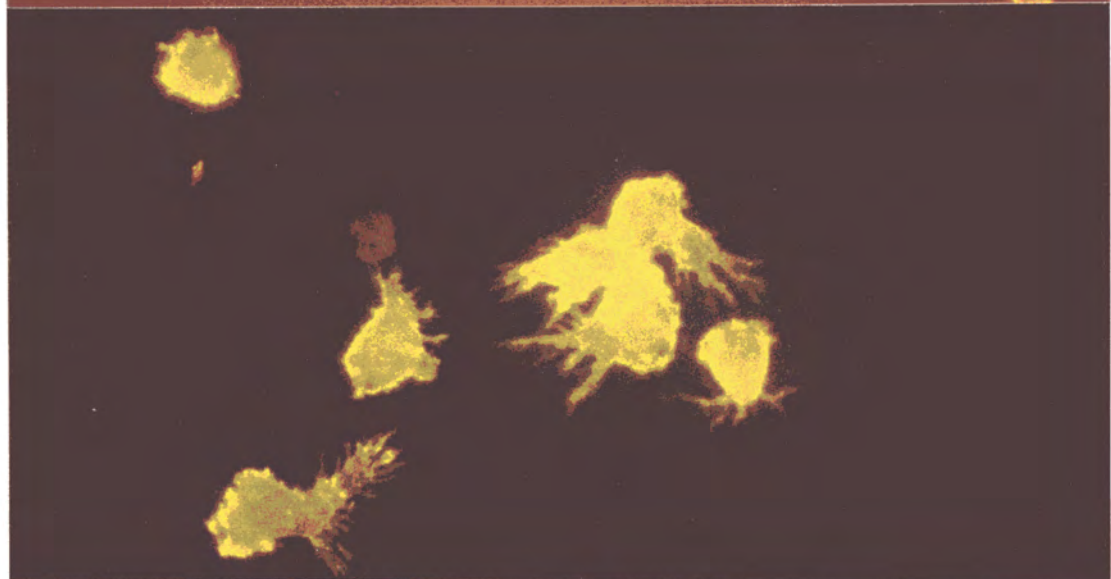
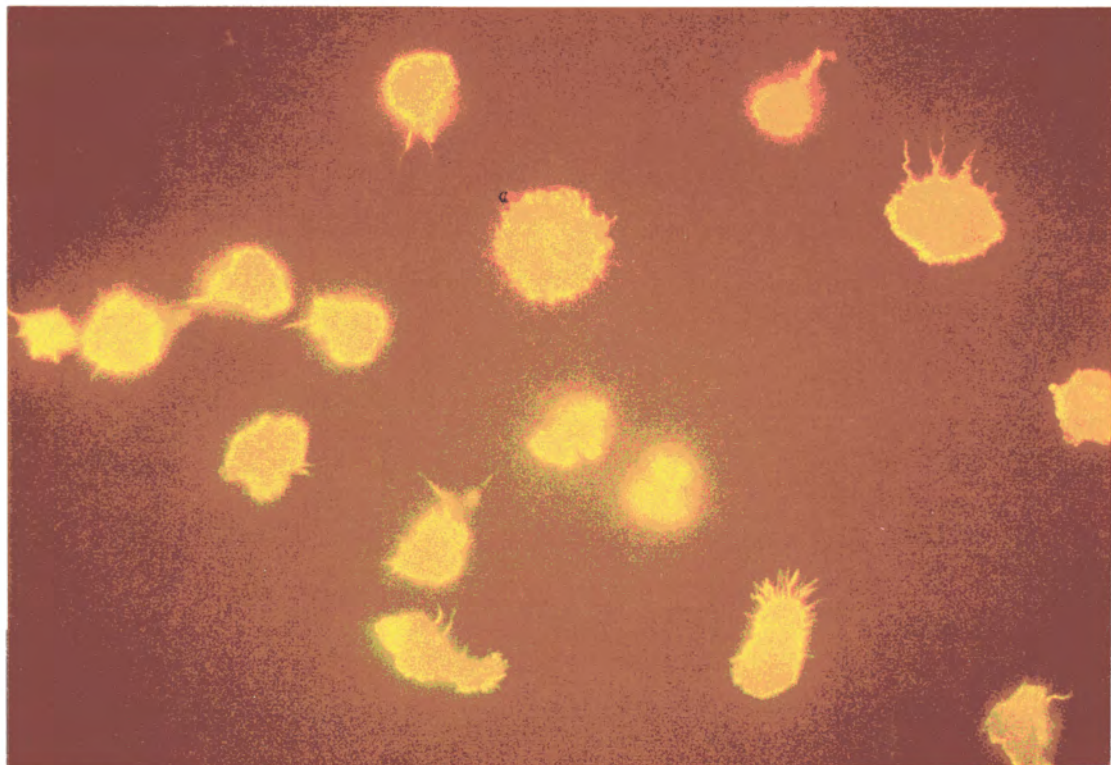


Figura 18. Los estímulos que inducen aumento de la afinidad de las integrinas $\beta 1$ por sus ligandos incrementan la adhesión celular en presencia del inhibidor citocalasina D. Los ensayos de adhesión celular a fibronectina (7.5 $\mu\text{g/ml}$) se realizaron en RPMI en presencia de los estímulos y AcMs (materiales y métodos). Las concentraciones utilizadas son: AcMs TS2/16 y HUTS-21, 10 $\mu\text{g/ml}$; éster de fórbol PdBu, 50nM; citocalasina D, 1 $\mu\text{g/ml}$.

3.15. El AcM HUTS-21 induce *spreading* celular.

HUTS-21 induce un aumento en la adhesión de todos los sistemas celulares analizados a los ligandos para integrinas $\beta 1$, similar a los obtenidos para el AcM activador anti- $\beta 1$ TS2/16. En presencia del inhibidor Cyt D, el AcM HUTS-21 solo es capaz de mantener cierta adhesión celular en los casos que induce un aumento en la afinidad "aparente" de las integrinas por sus ligandos. En los sistemas celulares que no ocurre esto, la adhesión celular en presencia del AcM HUTS-21 es revertida totalmente por la presencia de Cyt D. Todo esto demuestra que el mecanismo por el cual el AcM HUTS-21 induce adhesión en estos sistemas celulares a ligandos para integrinas $\beta 1$ es induciendo *spreading* celular. En las siguientes fotos de microscopía de fluorescencia, se muestra como el AcM HUTS-21 efectivamente induce *spreading* celular al igual que los ésteres de forbol (PdBu) en linfoblastos T (fig. 19). Resultados similares se obtuvieron para otros sistemas celulares como U-937

Figura 19. Microscopía de fluorescencia donde se demuestra que (B) el AcM HUTS-21 y (C) el éster de forbol PdBu inducen *spreading* celular en procesos de adhesión celular a fibronectina de linfoblastos T. (A) representa adhesión celular sin ningún tipo de estímulos. Los cubreobjetos se recubren con fibronectina (10 $\mu\text{g/ml}$), donde se permite la adhesión celular en presencia de los estímulos: AcM HUTS-21 a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y 50 nM de PdBu. Las células se fijaron, permeabilizaron y se tiñieron con faloidina conjugada con rodamina y analizadas por microscopía de fluorescencia.



5. DISCUSIÓN

Las integrinas son una familia de moléculas de la superficie celular que median adhesión entre células o entre células y diferentes componentes de la matriz extracelular. Estas adhesiones celulares vía integrina-ligando son de vital importancia en innumerables fenómenos biológicos, como por ejemplo: el desarrollo embrionario, la coagulación sanguínea, las reacciones inflamatorias y las respuestas inmunes. La correcta funcionalidad de las integrinas es un hecho imprescindible para un perfecto desarrollo de esos procesos biológicos. La descoordinación funcional de las integrinas va a ser la responsable de algunas enfermedades de una amplia gravedad. Por todo esto un conocimiento más profundo en la actividad de las integrinas se necesario para comprender mejor los procesos biológicos así como para subsanar las enfermedades derivadas de la desfuncionalidad de las mismas.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es caracterizar la regulación funcional de las integrinas VLA, usando como sondas AcMs específicos frente a distintas subunidades de estas integrinas.

Para alcanzar el objetivo propuesto en primer lugar purificamos, partiendo de mezclas de lisados de diferentes tejidos humanos y por técnicas de cromatografía de inmutafinidad, integrinas $\beta 1$ en conformación activada, es decir de alta afinidad por el ligando, utilizando el AcM activador anti- $\beta 1$ TS2/16 y en presencia de los cationes divalentes Mn^{2+} y Mg^{2+} . Posteriormente se inmunizan ratones Balb/c con la preparación de las integrinas $\beta 1$ purificadas y se realiza la fusión celular entre los linfocitos B del bazo del ratón inmunizado y la línea de mieloma de ratón SP2 para obtener los hibridomas productores de los correspondientes AcMs que se utilizarán para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Hasta el momento no se había caracterizado la regulación de la actividad funcional del miembro de la subfamilia de las integrinas VLA, $\alpha 1\beta 1$, por la falta de sondas específicas que lo permitiese. El primer objetivo que nos planteamos fue la obtención de un AcM anti-VLA-1 que nos permitiese analizar la regulación funcional del heterodímero VLA-1.

Trás la inmunización de los ratones, con preparaciones de integrinas $\beta 1$ purificadas a partir de un lisado de bazo humano, y la fusión celular para la obtención de los híbridos, la selección de los AcMs producidos por dichos hibridomas la hicimos comprobando la inhibición en la adhesión de dos líneas celulares humanas: NB100 (neuroblastoma) y DX3 (melanoma) a los ligandos para VLA-1 colágeno de tipo I y laminina. Utilizamos estos sistemas celulares por que eran óptimos para estudiar la adhesión celular a colágeno de tipo I mediada específicamente por el receptor VLA-1. La línea celular NB100 presenta niveles de expresión prácticamente indetectables de los otros receptores para colágeno de tipo I, VLA-2 y VLA-3, por lo que la adhesión celular a colágeno de tipo I se realiza principalmente a través del heterodímero VLA-1. La línea celular DX3 presenta niveles bajos de la integrina VLA-1 respecto a los que presentan los miembros VLA-2 y VLA-3, con lo cual la adhesión celular a colágeno de tipo I está mediada minoritariamente por VLA-1. La inhibición de la adhesión celular a laminina no se vió afectada en ninguno de los casos debido a la alta expresión del receptor para laminina, VLA-6, que presentan estas células. Sin embargo, en el proceso de selección encontramos un AcM que era capaz de inhibir la adhesión de la línea celular NB100 a colágeno de tipo I, pero no de la línea celular DX3. A este AcM, que era capaz de inhibir la adhesión de la línea celular de neuroblastoma humano NB100 a colágeno de tipo I, lo denominamos 5E8D9. El AcM 5E8D9 reconoce un epítipo en la subunidad α del heterodímero VLA-1: (1) la especificidad de la inhibición de la adhesión celular a colágeno de tipo I por parte de este AcM en las condiciones expuestas, (2) la expresión celular característica de VLA-1 (utilizando como control el anti VLA-1 TS2/7) que coincide con la del epítipo 5E8D9 y (3) por análisis de inmunoprecipitación a partir de lisados celulares marcados radiactivamente con ^{125}I .

La adhesión celular a colágeno de tipo I que experimentaba la línea celular NB100 en condiciones basales era de un 40%. Estos experimentos se desarrollaron tanto en RPMI como en condiciones fisiológicas controladas de cationes divalentes $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ (1-2mM). En este caso la totalidad de la adhesión celular viene mediada por

integrinas VLA como se muestra por la inhibición total de la adhesión celular en presencia del AcM inhibidor anti- $\beta 1$ L1a1/2. El hecho de que exista adhesión de la línea celular NB100 a colágeno de tipo I quiere decir que los receptores para el ligando de la familia de las integrinas VLA están activados y junto con la inhibición total de esa adhesión celular por parte del AcM anti VLA-1, 5E8D9, indican que bajo condiciones fisiológicas VLA-1 está constitutivamente activo y es capaz de mediar interacción con sus ligandos. Esta activación constitutiva parcial de VLA-1 sobre células NB100 claramente contrasta con miembros de otra familia de integrinas tal como la integrina leucocitaria LFA-1 donde la presencia de bajas concentraciones de Ca^{2+} completamente inactiva esta integrina incapacitando la interacción con su ligando ICAM-1 (Hogg y col. 1993). La activación diferencial de los distintos miembros de las integrinas es dependiente del tipo celular analizado y es de importante relevancia fisiológica, como por ejemplo, linfocitos resting son normalmente células circulantes no adherentes que no interacciona con otras células ni componentes de la matriz extracelular a no ser que se activen, mientras las células de neuroblastoma o melanoma tiene un fenotipo constitutivo adherente.

Nuestros resultados reflejan la necesidad de la presencia de cationes divalentes uniéndose a sus respectivos sitios en la subunidad α para la funcionalidad de la integrina VLA-1, así como que la regulación funcional depende de los tipos de cationes presentes en el medio. Los iones Mn^{2+} y Mg^{2+} inducen la activación de VLA-1 probablemente imponiendo una conformación que favorece la interacción con el ligando. Condiciones fisiológicas de concentraciones de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ (1-2mM) mantenían un estado activo de la integrina VLA-1 que permitía la interacción con el ligando. Por el contrario, la administración de cantidades mayores de ión Ca^{2+} junto al estado activado de la integrina VLA-1 en presencia de 2mM de Mg^{2+} , ejercían un efecto negativo dosis-dependiente en la adhesión de NB100 mediada por VLA-1. Estos mecanismos reguladores ejercidos por los cationes divalentes sobre la actividad de VLA-1 son similares a los descritos a otros miembros de la subfamilia de

las integrinas $\beta 1$ (VLA-3, VLA-4, VLA-5 y VLA-6) así como a integrinas pertenecientes a las familias de las integrinas $\beta 2$ y $\beta 3$ (Weitzman y col. 1993; Grzesiak y col. 1992; Mould y col. 1995; Shaw y col. 1993; Dransfield y col. 1992; Kirchhofer y col. 1991; Kirchhofer y col. 1990)

El AcM TS2/16 reconoce un epítipo en la subunidad $\beta 1$ de las integrinas VLA que induce un aumento en la activación de éstas moléculas o lo que es lo mismo un incremento en la afinidad de las integrinas $\beta 1$ por sus ligandos. Esto se ha descrito para VLA-3 (Weitzman y col. 1993), VLA-4 (Masumoto y Hemler, 1993), VLA-5 (Arroyo y col. 1992) y VLA-6 (Chan y Hemler, 1993). La adhesión de la línea celular NB100 a colágeno de tipo I se incrementa considerablemente en presencia del AcM TS2/16 en todas las condiciones de cationes divalentes testadas, reflejando la activación de los heterodímeros VLA. Excepto en condiciones de ausencia de los iones que no se produjo ese aumento en la adhesión celular, confirmando el requerimiento absoluto de cationes divalentes de las integrinas VLA para mediar adhesión a sus ligandos. Interesantemente, el AcM TS2/16 era capaz de mantener un importante porcentaje de la adhesión de NB100 a colágeno de tipo I en condiciones desfavorables de activación de las integrinas como es en presencia del catión Ca^{2+} . En experimentos realizados en estas condiciones, se observa inhibición de la adhesión de NB100 a colágeno de tipo I con los AcMs anti-VLA-1 5E8D9 y anti-VLA-2 12F1, con lo que se puede concluir que el AcM TS2/16 activa VLA-1 y VLA-2. Al igual que ocurre con VLA-1 y VLA-2, se ha descrito que el AcM TS2/16 es capaz de inducir activación del heterodímero VLA-3 en presencia de Ca^{2+} (Carter y col. 1990). La presencia de otros receptores, aunque en muy baja proporción, para colágeno de tipo I presente en la línea celular NB100, como son VLA-2 y VLA-3, explica que la inhibición celular observada por el AcM 5E8D9 nunca fue completa.

Posteriormente se ha descrito un AcM anti-VLA-1, 1B3.1, con capacidad de inhibir la adhesión celular a colágeno de tipo IV (Bank y col. 1994), cuyo epítipo se localiza en la zona que

comprende el dominio I, en el extremo N-terminal de la subunidad $\alpha 1$ (Kern y col. 1994).

La importancia de la obtención del AcM 5E8D9 no es únicamente por el hecho de que permite analizar la expresión de la integrina VLA-1 en distintos sistemas celulares, sino que permite analizar el estado de activación en el que se encuentra el heterodímero, así como investigar sobre los estímulos que pueden inducir la expresión del heterodímero y su activación. Las células endoteliales de diferentes vasos sanguíneos van a presentar distintos patrones de expresión de VLA-1, pudiendo ser regulada positivamente por citoquinas inflamatorias como TNF- α , el promotor de tumores PMA y el ácido retinoico. Este último regula la expresión de la integrina en otros muchos tipos celulares (Defilippi y col. 1991).

AcMs HUTS: reportadores del estado activado de las integrinas VLA

Las integrinas pueden presentar diferentes estados de activación sobre la superficie de los distintos sistemas celulares o lo que es lo mismo, tienen distintas capacidades de unirse a sus ligandos. Las interacciones de las integrinas con sus respectivos ligandos son reversibles, y el balance entre interacciones/no interacciones representa el mecanismo por el cual las células controlan sus propiedades adherentes. Para que la interacción sea efectiva y duradera las integrinas deben presentar un fenotipo activado: bien sea innato del tipo celular analizado o como consecuencia de una activación inducida por estímulos específicos. Por todo esto es de vital importancia disponer de sondas que nos permitan la caracterización de los estados de activación de las integrinas así como comprobar que estímulos y bajo que condiciones se modifica la afinidad de las integrinas por sus ligandos. Estas sondas se han obtenido en forma de AcMs para las integrinas $\beta 2$ y $\beta 3$, pero aún no se habían conseguido para integrinas VLA o $\beta 1$. Nuestro próximo objetivo fue conseguir un grupo de AcMs que se pudieran utilizar como marcadores del estado activado de las integrinas $\beta 1$.

Una vez purificadas las integrinas $\beta 1$ en conformación activada, a partir de una mezcla de lisados de pulmón, hígado y músculo esquelético humanos, procedimos a la inmunización de los ratones y la fusión celular. Seleccionamos, por técnicas de citometría de flujo, un grupo de tres AcMs que reconocían epítomos sobre linfoblastos T de una forma diferencial en presencia del ión Mn^{2+} respecto a la ausencia de cationes divalentes (RPMI + EDTA). La expresión de dichos epítomos coincidía con situaciones de activación de las integrinas $\beta 1$ como se muestra por ensayos de adhesión celular para ligandos de integrinas VLA. Utilizamos el sistema de linfoblastos T por que las integrinas VLA expresadas sobre en estas células pueden ser rápidamente activadas por el AcM activador anti- $\beta 1$ TS2/16 y/o el ión Mn^{2+} . A estos tres AcMs posteriormente los denominamos HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21.

Todos los esfuerzos por determinar la molécula que estaban reconociendo los AcMs HUTS sobre la superficie celular de los linfoblastos T nos confirmaron que reconocían epítomos en la subunidad $\beta 1$ de las integrinas VLA. Por técnicas de Western-Blot los AcMs HUTS tenían una banda correspondiente al peso molecular de la subunidad $\beta 1$, al igual que el AcM control TS2/16. Para asegurarse de la especificidad de los AcMs HUTS por la subunidad $\beta 1$, decidimos hacer inmunoprecipitación con los AcMs correspondientes a partir de lisado de ^{125}I -linfoblastos. Sorprendentemente, cuando la inmunoprecipitación se realizó en ausencia de cationes divalentes o en presencia de $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ los AcMs HUTS sólo precipitaban una banda coincidente con una movilidad electroforética que corresponde a la subunidad $\beta 1$, hecho que no coincidían con los resultados para el AcM control anti- $\beta 1$ TS2/16 que precipitaba la subunidad $\beta 1$ junto con las subunidades α asociadas. Pero, interesantemente, cuando la inmunoprecipitación se realizó en presencia del ión activador de las integrinas, Mn^{2+} , en los inmunoprecipitados de los AcMs HUTS aparecían las bandas correspondientes a las subunidades α , de igual manera que el AcM TS2/16. La explicación probable para estos resultados puede ser debida al proceso de lisis celular de los linfoblastos T previo a la inmunoprecipitación. El tampón de lisis

celular lleva el detergente TX100 al 1%, seguramente sea una concentración suficiente para que una cierta proporción de las integrinas VLA aparezcan disociadas en sus subunidades α y $\beta 1$. Cuando la inmunoprecipitación se realiza en ausencia de cationes divalentes o en presencia de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$, los AcMs HUTS solo inmunoprecipitan la subunidad $\beta 1$ correspondiente a las subunidades disociadas, debido a que el epítipo reconocido por estos AcMs esta enmascarado en el heterodímero completo, al igual que indican la falta de expresión de los epítopos HUTS en estas condiciones por técnicas de citometría de flujo. Por el contrario, el Mn^{2+} va a imponer una conformación específica a las integrinas VLA tal que va exponer el epítipo reconocido por los AcMs HUTS y van a ser capaz de inmunoprecipitar tanto las subunidades $\beta 1$ disociadas como las que están formando el heterodímero junto con las subunidades α asociadas. El Mn^{2+} va a imponer una conformación activada a las integrinas VLA seguramente uniéndose a los sitios de unión de los cationes divalentes presentes tanto en la región N-terminal de la cadena $\beta 1$ como en los sitios propios en las subunidades α . Otra prueba concluyente de la especificidad del reconocimiento de la subunidad $\beta 1$ por parte de los AcMs HUTS, se obtuvo al realizar la inmunoprecipitación en condiciones disociantes del heterodímero integrina en sus subunidades α y $\beta 1$ con un tratamiento de alto pH en presencia de Mn^{2+} , donde los AcMs HUTS precipitan las mismas bandas que el ACM control TS2/16 en todas las condiciones analizadas.

Como se muestra hasta ahora con la utilización del catión divalente Mn^{2+} , los datos reflejan que la expresión de los epítopos HUTS se correlaciona con la activación de las integrinas $\beta 1$. Esto queda demostrado empleando otros tipos de estímulos, tanto extracelulares como intracelulares, que induciendo la activación de las integrinas también inducen la expresión de los epítopos HUTS. Esto indica que las integrinas VLA en linfoblastos T no solo se activan desde el exterior celular, con estímulos como Mn^{2+} o TS2/16, sino también desde el interior celular con agentes como ésteres de forbol o ionóforos de calcio.

Un estudio más preciso de la regulación de la activación funcional de las integrinas VLA por cationes divalentes lo realizamos en linfoblastos T correlacionando la expresión de los epítomos HUTS con la adhesión celular a los ligandos para integrinas $\beta 1$ colágeno de tipo I, laminina y fibronectina. Como indican los perfiles de citometría de flujo, la activación de las integrinas VLA por la presencia de las cationes Mg^{2+} y Mn^{2+} se ve reflejada en el aumento de la expresión de los epítomos HUTS que se corresponde a un aumento en la adhesión celular a los ligandos testados. En condiciones fisiológicas de cationes divalentes, Ca^{2+} + Mg^{2+} , hay una mínima expresión de los epítomos HUTS que se correlaciona con niveles medios de adhesión celular. El ión Ca^{2+} ejerce un efecto inhibitor sobre la funcionalidad de las integrinas $\beta 1$, como se ilustra por la falta de expresión de los epítomos HUTS así como la inhibición de la adhesión celular a colágeno de tipo I y laminina, habiendo una debil adhesión al ligando fibronectina. Hay trabajos que exponen resultados relacionados en sistemas celulares distintos (Dransfield y col. 1992b; Grzesiak y col. 1992; Masumoto y Hemler, 1993; Weitzman y col. 1993).

La relevancia fisiológica de la utilización de los cationes por las integrinas puede asumirse que el Ca^{2+} extracelular mantiene las integrinas en células en reposo en un estado de baja o activación basal hasta que un estímulo induce la activación de las células alterando la conformación de las integrinas resultando en un incremento de adhesión celular a los ligandos apropiados. Qacordadamente, el AcM estimulador TS2/16 que induce activación de integrinas $\beta 1$, o NKI-L16 que induce activación de la integrina $\beta 2$ LFA-1, son capaces de activar las integrinas ionduciendo cambios conformacionales similares a los producidos como consecuencia de de la activación celular.

Hasta ahora los resultados de la expresión de los epítomos reportadores de activación HUTS se han obtenido con temperaturas fisiológicas (37°C). La incubación a 4°C de los linfoblastos T con cualquiera de los estímulos utilizados daban unos niveles de expresión prácticamente negativos de los epítomos HUTS. Todos estos

resultados indican la necesidad de un metabolismo celular intacto para que tenga lugar la activación de las integrinas VLA, característica que se ha puesto de manifiesto en otros sistemas celulares (Campanero y col. 1990; Wiel-van Kemenade y col. 1992).

Por técnicas de citometría de flujo y por análisis de competición de la unión de los AcMs a sus epítomos, demostramos que los AcMs HUTS-4, HUTS-7 y HUTS-21 reconocen el mismo epítomo o epítomos solapantes en la subunidad $\beta 1$. En colaboración con el Dr. Takada, mediante técnicas de Western-Blot y usando un panel de moléculas quiméricas $\beta 1$ humano/ratón purificadas, se demostró que los epítomos reconocidos por los AcMs HUTS se localizan en una zona próxima a los dominios ricos en cisteínas de la secuencia primaria del polipéptido $\beta 1$, entre los residuos 355-425. Hasta ahora solo se había descrito una pequeña región reguladora de la función de las integrinas VLA entre los residuos 207-218 de la subunidad $\beta 1$ humana (Takada y Puzon, 1993). Los AcMs que reconocen epítomos de esta región tienen efectos totalmente diferentes en la activación de las integrinas VLA: AcMs que activan las integrinas $\beta 1$ e inducen un aumento en la adhesión celular (como el AcM TS2/16) y otros que ejercen un efecto bloqueante en la adhesión mediada por integrinas $\beta 1$ (como el AcM Lia1/2). Con todos estos datos describimos una nueva región reguladora en la subunidad $\beta 1$ que se manifiesta posterior a la activación de las integrinas VLA. Para las integrinas $\beta 3$ se ha descrito un AcM, D3GP3, que reconoce un epítomo conformacional en la subunidad $\beta 3$ e induce la unión de fibrinógeno a un limitado grupo de integrinas $\alpha \text{IIb}\beta 3$. El epítomo reconocido por estos AcM se encuentra entre los residuos 422-692 de la subunidad $\beta 3$, cercano o en el interior de los dominios ricos en cisteínas (Kouns y col. 1990), al igual que los epítomos HUTS.

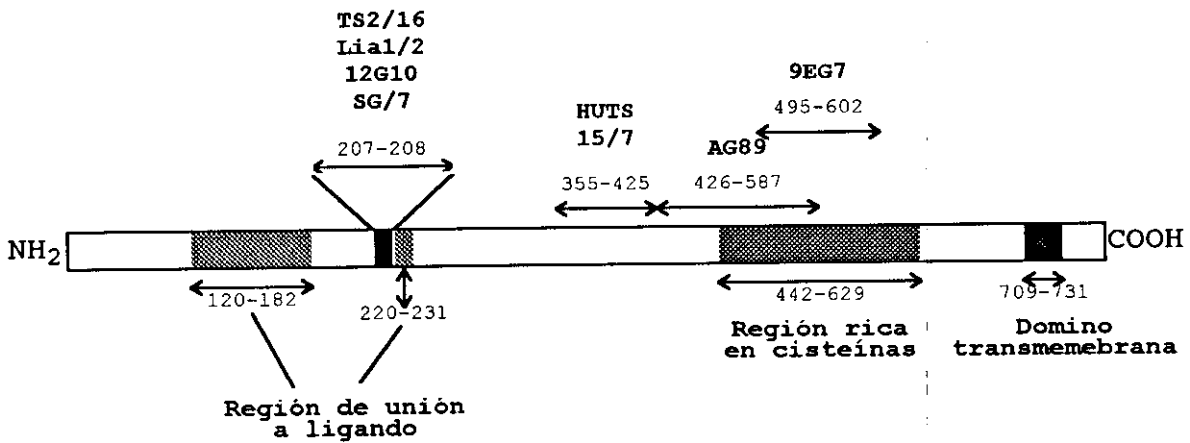
Hasta ahora hemos visto como la expresión de los epítomos HUTS depende de la activación de las integrinas $\beta 1$. Los epítomos HUTS también pueden ser inducidos por la unión de los ligandos a sus respectivas integrinas VLAs ("LIBS"), al igual que ocurre con

el epítipo reconocido por el AcM 24 para las integrinas $\beta 2$ (Cabañas y Hogg, 1993).

Varios trabajos recientes describen el uso de un AcM (15/7) que detecta un epítipo dependiente de la conformación activada de la subunidad $\beta 1$ en estudios de respuestas de células T en tejidos linfoides secundarios (Picker y col. 1993) y de la expresión de formas activadas de integrinas $\beta 1$ en enfermedades inflamatorias crónicas (Arroyo y col, 1995). Fue posterior a la utilización del AcM 15/7 como supuesto reportero de activación, cuando se realizó la caracterización parcial del epítipo 15/7, refiriéndose solo al heterodímero VLA-4 (Yednock y col. 1995); y más tarde se mapeo el epítipo 15/7 en la misma región que los epítipos HUTS (Puzon-McLaughlin y col. 1996).

Otros adicionales AcMs específicos de epítipos dependientes de la activación de la subunidad $\beta 1$ han sido recientemente caracterizados. El AcM 9EG7 reconoce un epítipo en la subunidad $\beta 1$ de células de ratón que se expresa específicamente en presencia de ésteres de forbol o Mn^{2+} (Lenter y col. 1993). En contra del efecto potenciador de la adhesión celular de los AcMs HUTS, el AcM 9EG7 inhibe la adhesión celular mediada por integrinas VLA. Recientemente se ha caracterizado el epítipo como un *LIBS*, pero, al contrario que ocurre con los epítipos HUTS, no se muestra una correlación directa entre activación de las integrinas VLA y expresión del epítipo 9EG7, quizás debido a que se localiza en la región rica en cisteínas entre los residuos 495-602 de la subunidad $\beta 1$ (Bazzoni y col. 1995). El AcM denominado SG/7, detecta un epítipo conformacional impuesto en la molécula $\beta 1$ humana por cualquiera de los cationes divalentes Ca^{2+} o Mn^{2+} y no puede ser inducido por el tratamiento con ésteres de forbol (Miyake y col. 1994). Otros AcM anti-*LIBS* se han descrito para la subunidad $\beta 1$ muy diferentes a los epítipos HUTS. El AcM 12G10 reconoce un epítipo del tipo *LIBS* en la subunidad $\beta 1$ de células de rata que se encuentra en una región, donde se han caracterizado la mayoría de AcMs funcionales, entre los residuos 207-218 y le confiere la

capacidad de aumentar la adhesión celular (Mould y col. 1995). Recientemente se ha descrito un AcM designado AG89 que reconoce en la subunidad $\beta 1$ un epítipo en la zona rica en cisteínas entre los residuos 426-587. Este AcM comparte características de expresión similares a los AcMs HUTS, pero difiere en la capacidad que presenta el AcM AG89 por si mismo de activar las integrinas $\beta 1$ que se encuentran en estado de reposo (Takagi y col. 1997). Todos estos trabajos indican que múltiples sitios localizados en diferentes regiones de la subunidad $\beta 1$ pueden ser expuestos después de la unión del ligando.



Esquema lineal de la subunidad $\beta 1$ humana. En este diagrama se representa los dominios característicos de la cadena $\beta 1$ humana así como algunos de los AcMs que reconocen epítopos funcionales descritos en el texto.

Extendiendo el estudio de las propiedades en la expresión de los AcMs HUTS a distintos sistemas celulares, obtuvimos resultados similares que los comentados para los linfoblastos T, concluyendo que: la expresión de los epítopos HUTS se da en situaciones de activación de las integrinas VLA en todos los tipos celulares $\beta 1$ -positivos y representa estados fisiológicos o funcionales en los que se encuentra dichas integrinas.

Estudios de unión de ligando soluble marcado radiactivamente (^{125}I -Fn) desvelan efectivamente como los estímulos que inducen un aumento en la expresión de los epítomos HUTS también aumentan la afinidad de las integrinas $\beta 1$ por sus ligandos, demostrando que los AcMs HUTS son reportadores del estado de la afinidad de las integrinas $\beta 1$ por sus ligandos.

1) El estado parcialmente activo del heterodímero VLA-1 en la línea celular NB100; 2) estudios previos de adhesión celular, realizados en nuestro laboratorio, a ligandos para integrinas $\beta 1$ muestran diferencias en el porcentaje de la adhesión celular basal dependiendo tanto del sistema celular analizado como del ligando testado; 3) en algunos sistemas celulares se ha descrito como determinados miembros de las integrinas VLA tienen distintas capacidades de unir ligando (Faull y col. 1993). Los puntos anteriores indican que las integrinas VLA van a presentar distintas capacidades de interaccionar, en estado de reposo, con sus ligandos, dependiendo del sistema celular así como del heterodímero analizado. La demostración definitiva para esta hipótesis se realizó analizando como, efectivamente, existen diferencias en la expresión basal de los epítomos HUTS sobre diferentes sistemas celulares, que realmente corresponden a diferentes estados de activación de las integrinas $\beta 1$ como reflejan los ensayos de adhesión celular. Las dos posibles explicaciones para interpretar la diferente expresión basal de los epítomos HUTS son: 1) las propias características de las células, su procedencia y el estado de activación general de las mismas, van a determinar la activación basal de las integrinas VLA y por lo tanto la expresión de los epítomos HUTS. 2) La expresión de los epítomos HUTS puede ser debida al comportamiento de estos epítomos como LIBS. Esto queda demostrado al menos para uno de los casos analizados en este trabajo: la línea celular K562.

La activación diferencial de los distintos miembros de las integrinas es dependiente del tipo celular analizado y es de importante relevancia fisiológica, como linfocitos resting son normalmente células circulantes no adherentes que no interacciona

con otras células ni componentes de la matriz extracelular a no ser que se activen, mientras las células de neuroblastoma o melanoma tiene un fenotipo constitutivo adherente.

Mecanismo de acción de los AcMs HUTS en el incremento de la adhesión celular

Los AcMs HUTS inducen un aumento en la adhesión celular a ligandos para integrinas VLA similar al producido por el AcM activador anti- $\beta 1$ TS2/16. A pesar de que el efecto neto en el incremento de la adhesión celular es el mismo, los mecanismos de acción de los dos tipos de AcMs deben ser distintos.

1) Ensayos de adhesión celular realizados pretratando las células con los respectivos AcMs y lavando el exceso de AcM no acoplado, desvelaron una primera aproximación de como efectivamente el mecanismo es diferente: el epítipo reconocido por el AcM TS2/16 se expresa constitutivamente y la unión del AcM va a inducir un aumento en la afinidad de las integrinas por sus ligandos probablemente mediado por un cambio conformacional que favorezca la unión por los ligandos (Arroyo y col. 1992, 1993; van de Wiel-van de Kemenade, 1992). Sin embargo, los epítipos HUTS no se expresan constitutivamente en los diversos sistemas celulares. Cuando se pretratan las células con los AcMs HUTS, solo las subunidades $\beta 1$ que presenten el epítipo podrá unir los AcMs HUTS, que posteriormente afectará a la adhesión celular. Esto apunta a que el mecanismo por el cual los AcM HUTS inducen adhesión celular no es por un cambio conformacional en la integrina.

2) En los ensayos de adhesión celular se desarrollan interacciones de tipo transitorias entre integrina-ligando, aunque en algunos casos sean muy débiles coincidiendo con los tipos celulares que presentan bajos niveles de activación de las integrinas. Esto indica que los AcMs HUTS van a ser capaces de unirse a las conformaciones que están interaccionando integrina-ligando manteniéndolas "congeladas" dando un resultado de aumento

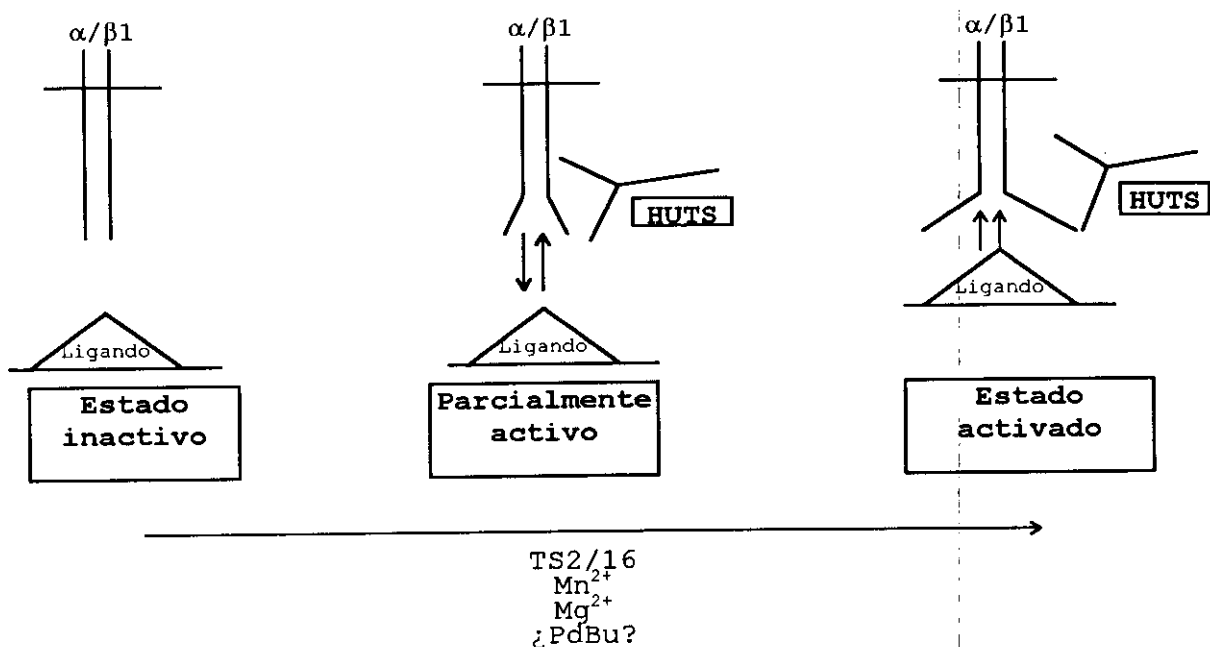
en la adhesión celular, sin inducir ningún tipo de cambio conformacional.

3) Los AcMs HUTS no alteran la afinidad real de las integrinas por los ligandos sino que solo en los casos en los que los epítomos HUTS están preexpuestos, los AcMs HUTS son capaces de incrementar la afinidad "aparente" de las integrinas. En los sistemas celulares que hay expresión basal de los epítomos HUTS se van a favorecer la interacción integrina-ligando y la presencia de los AcMs HUTS "congelaría" esa conformación desplazando el equilibrio hacia un aumento en la afinidad aparente de la integrina por el ligando. El comportamiento *LIBS* de los epítomos HUTS no se pone de manifiesto en estos experimentos seguramente por que la fibronectina total es un ligando que tiene poca afinidad para las integrinas VLA. En el caso de haber dispuesto de otros tipos de ligandos con más afinidad por parte de las integrinas, por ejemplo FN80 o VCAM-1, posiblemente la presencia de cantidades crecientes del ligando en solución indujera la expresión de los epítomos HUTS y la presencia de los AcMs uniéndose a sus epítomos incrementará la unión del ligando y por lo tanto la afinidad "aparente".

4) Por último, para concretar el mecanismo de acción de los AcMs HUTS como inductores de adhesión celular decidimos analizar en profundidad el hecho propio del experimento. A parte de la afinidad de la integrina por el respectivo ligando, en los procesos de adhesión celular interviene el fenómeno de la avidez o la probabilidad de interacción integrina-ligando, en este caso juega un papel muy importante el aplastamiento o *spreading* celular. Los ensayos de adhesión celular en presencia del inhibidor de la polimerización del citoesqueleto de actina, citocalasina D, y por lo tanto del *spreading* celular son muy útiles para discernir entre afinidad/avidez, ya que la adhesión celular que se presente bajo esta condición va a ser debida principalmente a la afinidad de la integrina por el ligando. Los resultados indican, efectivamente, que en los casos que los AcMs HUTS inducen un aumento en la afinidad "aparente" de las integrinas, el aumento en la adhesión celular se mantenía incluso en presencia de Cyt D. Mientras que en los sistemas celulares que los AcMs HUTS no inducen un estado de

alta afinidad de las integrinas $\beta 1$ por sus ligandos, los ensayos en presencia de Cyt D no permite a las células que se aplanen y la probabilidad de interacción integrina-ligando es mucho menor resultando en niveles de adhesión casi basales. Todo esto demuestra que uno de los mecanismos por el cual los AcMs HUTS están induciendo adhesión celular es favoreciendo la avidéz celular induciendo *spreading* celular.

Conclusión: tanto los AcMs HUTS como el AcM TS2/16 funcionalmente inducen aumento en la adhesión celular a ligandos para las integrinas VLA. Todos nuestros resultados demuestran que el mecanismo de acción por el cual ambos AcMs inducen adhesión celular es distinto: el AcM TS2/16 reconoce un epítipo constitutivo de las integrinas $\beta 1$ sobre la membrana celular y probablemente va a inducir un cambio conformacional que aumenta la afinidad de integrina-ligando (Arroyo y col. 1992, 1993; van de Wiel-van de Kemenade, 1992). Mientras que la inducción de la adhesión celular mediada por los AcMs HUTS va a ser más compleja: en general todos los resultados se acercan a la idea de que el AcM HUTS-21 va a mantener congelada las interacciones reversibles integrina-ligando que, aunque algunas veces sea con muy baja afinidad, se produce de forma espontánea. Como demostramos, el AcM HUTS-21 va a inducir un aumento en el *spreading* celular que favorece la adhesión celular.



Mecanismo de acción de los AcMs HUTS en el incremento de la adhesión celular. En el esquema se muestran los tres estados de activación o de capacidad de unir ligandos en los que se pueden encontrar las integrinas VLA dependiendo del tipo celular analizado. 1) En el estado inactivo las integrinas son incapaces de interaccionar con el ligando, salvo su previa estimulación. 2) En el estado parcialmente activo, se dan interacciones integrina-ligando de tipo reversibles, de tal manera que si no hay algún estímulo que desvíe el equilibrio hacia un estado de alta afinidad la adhesión celular no será efectiva. En este estado ya hay algo de reconocimiento de los epítomos por parte de los AcMs HUTS sobre la subunidad $\beta 1$. Esto junto con la propiedad que tienen estos epítomos de expresarse cuando hay interacción entre integrina y ligando (LIBS) hace que los AcMs HUTS reconozcan el correspondiente epítomo y "congelen" la conformación integrina-ligando, resultando en un aumento en la adhesión celular. 3) En el caso del estado activado de las integrinas $\beta 1$, ya existe interacción integrina-ligando, lo que resulta en una cierta adhesión celular. En este caso hay una expresión en mayor proporción de los epítomos HUTS, lo que facilita la unión de los correspondientes AcMs y por lo tanto la "congelación" de esa conformación resultando en el aumento de la adhesión celular. Otros estímulos, como el AcM TS2/16, los cationes divalentes Mn^{2+} y Mg^{2+} , y en algunos casos los ésteres de forbol, aumentan la adhesión celular induciendo un estado de alta afinidad de las integrinas por el ligando independiente del estado de activación en el que se encuentren las integrinas. **Conclusión:** Los AcMs HUTS inducen aumento de la adhesión celular mediada por integrinas VLA, no por un cambio en la conformación de las integrinas hacia un estado de alta afinidad, sino por el reconocimiento de los epítomos sobre la subunidad $\beta 1$ que al menos está parcialmente interaccionando con el ligando y "congelando" esa conformación. A este mecanismo de acción se le tiene que unir la capacidad de los AcMs HUTS de inducir *spreading* celular.

Mecanismos similares han sido propuestos para explicar los efectos funcionales ejercidos por otros AcMs reporteros de la

activación específicos para las integrinas $\beta 2$ y $\beta 3$. La unión del AcM 24 a su epítipo a las subunidades α de las integrinas $\beta 2$ inhiben las respuestas proliferativas de células T, la actividad asesina de los linfoblastos T activados con linfoquinas, y la quimiotaxis inducida por f-Met-Leu-Phe en neutrófilos. Todos estos efectos funcionales del AcM 24 pueden ser explicados asumiendo que impide la desunión de los pares integrina-ligando, posiblemente por la congelación de las integrinas en una conformación activa con el ligando unido firmemente. El epítipo 24 también se comporta como un LIBS (Dransfield y col. 1992b; Cabañas y Hogg, 1993).

Los ésteres de forbol en la activación de integrinas VLA.

Las proteínas kinasas son enzimas que se han implicado en muchos procesos celulares, así como en adhesión celular mediada por receptores específicos. De todas ellas, la proteína kinasa C (PKC) es una de las más importantes en la modulación de la adhesión. Los ésteres de forbol son agentes capaces de estimular PKC (Nishikuza 1984) y así, entre otras respuestas, modular la morfología y adhesión celular: 1) interrumpiendo el citoesqueleto y redondeando las células (Schliwa y col. 1984). 2) En la mayoría de los casos, los ésteres de forbol incrementan la adhesión y spreading celular (Jarvinen y col. 1987; Brown 1988; Shiba y col. 1988). Por todo esto es muy importante estudiar los mecanismos por los cuales los ésteres de forbol inducen aumento en la adhesión celular.

El tratamiento de las células con ésteres de forbol inducen un aumento de la afinidad de las integrinas $\beta 2$ y $\beta 3$ (Plow y col. 1989) a sus respectivos ligandos. La diferenciación de U-937 con PMA hacia un fenotipo monocítico incrementa la afinidad del receptor Mac-1 a su ligando fibrinógeno (Altieri y col. 1988; Dustin y Springer 1989).

En integrinas $\beta 1$ no está muy claro hasta ahora como afectan los ésteres de forbol en la adhesión celular. La mayoría de los autores apuntan a los ésteres de forbol incrementan la adhesión celular por mecanismos que tienen lugar después de la unión del

ligando al receptor, *spreading* celular, y no afectando a la afinidad del receptor (Danilov y Juliano, 1989; Faull y col. 1994).

En nuestro trabajo describimos como los ésteres de forbol inducen un aumento en la adhesión celular de todo los sistemas celulares analizados a los ligandos de integrinas VLA. El mecanismo de acción de los ésteres de forbol depende del tipo celular. Dependiendo del tipo celular analizado, en unos casos los ésteres de forbol son capaces de inducir directamente aumento en la afinidad de las integrinas por sus ligandos, como se muestra por la expresión de los epítomos HUTS y ensayos de unión de ligando soluble (^{125}I -Fn). Mientras que en los otros casos los ésteres de forbol no afectan a la afinidad de las integrinas, simplemente inducen adhesión favoreciendo el *spreading* celular. Todos estos resultados tienen su correlación funcional en los ensayos de adhesión celular en presencia del inhibidor citocalasina D.

Las integrinas son una familia de moléculas de la superficie celular que median adhesión entre células o entre células y diferentes componentes de la matriz extracelular. Las integrinas pueden presentar distintos estados de activación, teniendo en cuenta que únicamente va a haber interacción con el ligando en los casos que las integrinas se encuentren en estados activados. La estimulación en la activación de las integrinas puede ser debida tanto a estímulos extracelulares como intracelulares. Las adhesiones celulares mediadas por integrinas son de vital importancia en innumerables fenómenos biológicos, como son: el desarrollo embrionario, la coagulación sanguínea, las reacciones inflamatorias y las respuestas inmunes. Estas interacciones integrina-ligando también son importantes en procesos patológicos interviniendo en el rechazo de transplantes o actuando como receptores para patógenos; y en otros casos, como en el proceso tumoral y artritis reumatoide donde la activación de algunos de los miembros de las integrinas puede estar alterada. Los procesos patológicos también puede ser derivados de la deficiencia en la

funcionalidad de algunos de los miembros de las integrinas, como son el caso de la deficiencia de la adhesión leucocitaria (LAD) y trombostemia de Glanzman. Por todo esto es imprescindible un conocimiento profundo de las características funcionales de las integrinas así como investigar acerca de los estímulos que regulan su actividad y los que les conducen a un fenotipo patológico.

Los AcMs que describimos en esta Tesis Doctoral, HUTS y 5E8D9, son herramientas muy útiles para analizar las características funcionales de las integrinas $\beta 1$ en general, así como del heterodímero VLA-1 en concreto. Estos AcMs podrán ser utilizados y de hecho se están utilizando para definir los estados de activación de las integrinas $\beta 1$ en todos los sistemas celulares y analizar bajo que circunstancias y estímulos se producen fenómenos patológicos derivados de la descoordinación funcional de las integrinas VLA, así como investigar sobre la posible implicación de la desfuncionalidad de las integrinas VLA en otros fenómenos patológicos. Dependiendo de los resultados observados las terapias a seguir podrían ser: 1) aplicar AcMs contra los miembros implicados de las integrinas $\beta 1$ o los péptidos miméticos para las integrina involucradas que eliminase el estado patológico, 2) o bien, averiguando los estímulos que están provocando la situación patológica intentar neutralizarlos para recobrar el estado normal.

6. CONCLUSIONES

1.- El AcM 5E8D9 reconoce un epítopo en el heterodímero VLA-1 que tiene la capacidad de inhibir la adhesión celular a sus respectivos ligandos.

2.- Los cationes divalentes Mg^{2+} o Mn^{2+} inducen activación de la integrina VLA-1. Por el contrario, el ión Ca^{2+} ejerce un efecto inhibitorio sobre la funcionalidad del heterodímero.

3.- El AcM activador anti- $\beta 1$ TS2/16 induce activación de los heterodímeros VLA-1 y VLA-2.

4.- Los AcMs HUTS reconocen epítopos de activación situados entre los residuos 355-425 de la subunidad $\beta 1$, describiendo una nueva región reguladora de la funcionalidad de las integrinas VLA-1.

5.- Los epítopos HUTS se comportan como *LIBS*.

6.- Los ésteres de forbol tienen un diferente comportamiento en la regulación de la afinidad de las integrinas VLA dependiendo del sistema celular analizado.

7.- Distintos tipos celulares presentan distintos estados de activación basal de las integrinas VLA.

8.- Los AcMs HUTS inducen activación funcional de las integrinas $\beta 1$ por mecanismos que no afectan a la afinidad de las integrinas: manteniendo "congelada" la conformación integrina-ligando e induciendo *spreading* celular.

7. BIBLIOGRAFÍA

- *Albelda, S.M. and Buck, C.A. (1990). Integrin and other cell adhesion molecules. *The FASEB Journal*. **4**: 2868-2880.
- *Albelda, S.M. (1993). Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.* **68**: 4-17.
- *Alon, R., Kassner, P.D., Carr, M.W., Finger, E.B., Hemler, M.E and Springer, T.A. (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J. Cell Biol.* **128**: 1243-1253.
- *Altevoigt, P., Hubbe, M., Ruppert, M., Lohr, J., von Hoegen, P., Sammar, M., Andrew, D.P., Mc Evoy, L., Humphries, M.J. and Butcher, E.C. (1995). The $\alpha 4$ integrin chain is a ligand for $\alpha 4\beta 7$ and $\alpha 4\beta 1$. *J. Exp. Med.* **182**: 345-355.
- *Altieri, D.C., Bader, R., Manucci, P.M. and Edgington, T.S. (1988). Oligospecificity of the cellular adhesion receptor MAC-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J. Cell Biol.* **107**: 1893-1900.
- *Anderson, D.C., Schmalsteig, F.C., Finegold, M.J., Hughes, B.J., Rotlein, R., Miller, L.J., Kohl, S., Tosi, M.F., Jacobs, R.L. Waldrop, T.C., Goldman, A.C. Shearer, W.T. and Springer, T.A. (1985). The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J. Infect Dis.*, **152**: 668-689.
- *Arroyo, A.G., Sánchez-Mateos, P., Campanero, M.R., Martín-Padura, I., Dejana, E. and Sánchez-Madrid, F. (1992). Regulation of the VLA integrin-ligand interactions through the $\beta 1$ subunit. *J. Cell. Biol.* **117**: 659-670.
- *Arroyo, A.G., García-Pardo, A. and Sánchez-Madrid, F. (1993). A high affinity conformational state by an anti- $\beta 1$ chain monoclonal antibody. *J. Biol. Chem.* **268**: 9863-9868.
- *Arroyo, A.G., García-Vicuña, R., Marazuela, M., Yednock, T.A., González-Amaro, R. and Sánchez-Madrid. (1995). Expression and significance of an activation-dependent epitope of the beta 1 integrins in chronic inflammatory diseases. *Eur. J. Immunol.* **25**: 1720-1728.
- *Bank, I., Book, M. and Ware, R. (1994). Functional role of VLA-1 (CD49a) in adhesion, cation-dependent spreading, and activation of cultured human T lymphocytes. *Cell. Immunol.* **156**: 424-437
- *Barnstable, C.J., Bodurer, W.F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A.F. and Ziegler, A. (1978). Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigen: new tools for genetic analysis. *Cell*. **14**: 9-20.

- *Bazzoni, G., Shih, D.T., Buck, C.A. and Hemler, M.E. (1995). Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel $\beta 1$ integrin epitope induced by soluble ligands and manganese, but inhibited by calcium. *J. Biol. Chem.* **270**: 25570-25577.
- *Bergelson, J.M., Shepley, M.P., Chan, B.M.C., Hemler, M.E. and Finberg, R.W. (1992). Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science*. **255**: 1718-1720.
- *Brooks, P.C., Stromblad, S., Sanders, L.C., von Schascha, T.L., Aimes, R.T., Stetler-Stevenson, W.G., Quigley, J.P. and Cheresch, D.A. (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with $\alpha v \beta 3$. *Cell*. **85**: 683-693.
- *Brown, P.J. (1988) Phorbol ester stimulation of fibronectin mediated adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**: 603-607.
- *Cabañas, C., Sánchez-Madrid, F., Acevedo, A., Bellón, T., Fernández, J.M., Larraga, V. and Bernabeu, C. (1988). Characterization of a CD11c-reactive monoclonal antibody (HC1/1) obtained by immunizing with phorbol ester differentiated U-937 cells. *Hybridoma*. **7**: 167-176
- *Cabañas, C. and Hogg, N. (1993). Ligand intercellular adhesion molecule 1 has a necessary role in activation of integrin lymphocyte function-associated molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 5838-5842.
- *Calderwood, D.A., Tuckwell, D.S., Eble, J., Kuhn, K. and Humphries, M.J. (1997). The integrin $\alpha 1$ A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin. *J. Biol. Chem.* **272**: 12311-12317.
- *Campanero, M.R., Pulido, R., Ursa, M.A., Rodriguez-Moya, M., de Landázuri, M.O. and Sánchez-Madrid, F. (1990). An alternative leukocyte homotypic adhesion mechanism, LFA-1/ICAM-1-independent, triggered through the human VLA-4 integrin. *J. Cell Biol.* **110**: 2157-2165.
- *Campanero, M.R., García-Arroyo, A., Pulido, R., Ursa, M.A., de Matías, M.S., Sánchez-Mateos, P., Kassner, P.D., Chan, B.M.C., Hemler, M.E., Corbí, A.L., de Landázuri, M.O. and Sánchez-Madrid, F. (1992). Functional role of $\alpha 2 \beta 1$ and $\alpha 4 \beta 1$ integrins in leukocyte intercellular adhesion induced through the common $\beta 1$ subunit. *Eur. J. Immunol.* **22**: 3111-3119.
- *Campanero, M.R., del Pozo, M.A., García-Arroyo, A., Sánchez-Mateos, P., Hernandez-Caselles, T., Craig, A., Pulido, R. and Sánchez-Madrid, F. (1993). ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway. *J. Cell Biol.* **123**: 1007-1016.
- *Campanero, M.R., Sánchez-Mateos, P., del Pozo, M.A. and Sánchez-Madrid, F. (1994). ICAM-3 regulates lymphocyte morphology and

integrin-mediated T cell interaction with endothelial cell and extracellular matrix ligands. *J. Cell Biol.* 127: 867-878.

*Carlos, T.M. and Harlan, J.M. (1994). Leukocyte-Endothelial Adhesion Molecules. *Bood.* 84: 2068-2101.

*Carter, W.G., Wayner, E.A., Bouchard, T.S. and Kaur, P. (1990). The role of integrin alpha2beta1 and alpha3beta1 in cell-cell adhesion and cells substrate adhesion of human epidermal cells. *J. Cell Biol.* 110: 1387-1404.

*Chan, B.M. and Hemler, M. (1993). Multiple functional forms of the integrin VLA-2 can be derived from a single alpha 2 cDNA clone: interconversion of forms induced by an anti-beta 1 antibody. *J. Cell Biol.* 120: 537-543.

*Clark, E.A. and Brugge J.S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 268: 233-268.

*Danilov, Y.N. and Juliano, R.L. (1989). Phorbol ester modulation of integrin-mediated cell adhesion: a postreceptor event. *J. Cell Biol.* 108: 1925-1933.

*Defilippi, P., van Hinsbergh, V., Bertolotto, A., Rossino, P., Silengo, L. and Tarone, G. (1991). Differential distribution and modulation of expression of alpha1/beta1 on human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 114: 855-863.

*Dhawan, J., Lichtler, A.C., Rowe, D.V. and Famer, S.R. (1991). Cell adhesion regulates proalpha 1(I) collagen mRNA stability and transcription in mouse fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 266: 8470-8475.

*Dransfield, I. And Hogg, N. (1989). Regulated expression of magnesium binding epitope on leukocyte integrin a subunits. *Embo J.* 8: 3759-3765.

*Dransfield, I., Buckle, A.M. ang Hogg, N. (1990). Early events of the immune response mediated by leukocyte integrin. *Immunol. Rev.* 114: 29-44.

*Dransfield, I., Cabañas, C., Craig, A. and Hogg, N. (1992a). Divalent-cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J. Cell Biol.* 116: 219-226.

*Dransfield, I., Cabañas, C., Barret, J. and Hogg, N. (1992b). Interaction of leukocyte integrin with ligand is necessary but not sufficient for function. *J. Cell Biol.* 116: 1527-1535.

*Dustin, M.L. and Springer, T.A. (1989). T-cell receptor crosslinking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature.* 341: 619-624.

*Eugene C. Butcher and Louis J. Picker (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 272:60-66.

- *Faull, R.J., Kovach, N.L., Harlan, J.M. and Ginsberg, M.H. (1993). Affinity modulation of integrin $\alpha 5 \beta 1$: regulation of the functional response by soluble fibronectin. *J. Cell Biol.* **121**: 155-162.
- *Faull, R.J., Kovach, N.L., Harlan, J.M. and Ginsberg, M.H. (1994). Stimulation of integrin-mediated adhesion of T lymphocytes and monocytes: Two mechanisms with divergent biological consequences. *J. Exp. Med.* **179**: 1307-1316.
- *Forsberg, E., Ek, B., Engström, A. and Johansson, S. (1994). Purification and characterization of integrin $\alpha 9 \beta 1$. *Exp. Cell Res.* **213**: 183-190.
- *Giancotti, F.G. and Mainiero, F. (1994) Integrin-mediated adhesion and signalig in tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1198**: 47-64.
- *Grzesiak, J.J., Davis, G.E., Kichhofer, M.D. and Pierschbacher, M.D. (1992). Regulation of $\alpha 2 \beta 1$ -mediated fibroblasts migration on type I collagen by shifts in the concentrations of extracellular Mg^{2+} and Ca^{2+} . *J. Cell Biol.* **117**: 1109-1117.
- *Gumbiner, B.M. and McCrea, P.D. (1993). Catenins as mediators of the cytoplasmic function of cadherins. *J. Cell Sci. Suppl.* **17**: 155-158.
- *Hall, D.E., Reichardt, L.F., Crowley, E., Holley, B., Moezzi, H., Sonnenberg, A. and Damsky, C.H. (1990). The $\alpha 1 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta 1$ integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J. Cell Biol.* **110**: 2175-2184.
- *Hartfield, P.J., Greaves, M.W. and Camp, R.D.R. (1993). Beta-1 integrin-mediated T cell adhesion is regulated by calcium ionophores and endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **196**: 1183-1187.
- *Hemler, M.E., Sánchez-Madrid, F., Flotte, T.J., Krensky, A.M., Burakoff, S.J., Bhan, A.K., Springer, T.A. and Strominger, J.L. (1984). Glycoproteins of 210,000 and 130,000 mw on activated T cells: cell distribution and antigenic relations to components on resting cells and T cell lines. *J. Immunol.* **132**: 3011-3018.
- *Hemler, M.E., Crouse, C. and Sonnenberg, A. (1989). Association of the VLA $\alpha 6$ subunit with a novel protein. *J. Biol. Chem.* **264**: 6529-6535.
- *Hemler, M.E. (1990). VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 365-400.
- *Hermanowski-Vosatka, A., Van Strijp, J.A.G., Swiggard, W.J. and Wright, S.D. (1992). Integrin modulating factor-1: a lipid that alters the function of leukocytes integrins. *Cell* **68**: 341-352.

- *Hogg, N., Harvey, J., Cabañas, C. and Landis, R.C. (1993). Control of leukocyte integrin activation. *Am. Rev. Respir. Dis.* **148**: 55-59.
- *Hogg, N. and Landis, C. (1993). Adhesion molecules in cell interactions. *Current opinion in immunology.* **5**: 383-390.
- *Hogg, N., Landis, C., Bates, P.A. Stanley, P. and Randi, A.M. (1994). The sticking point: how integrin bind to their ligands. *Trends in cell biology.* **4**: 379-382.
- *Hynes, R.O. (1987). Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* **48**: 549-554.
- *Hynes, R.O. (1992). Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
- *Isberg, R.R. and Leong, J.M. (1990). Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* **60**: 861-871.
- *Jarvinen, M., Ylanne, J., Vartio, T. and Virtanen, I. (1987) Tumor promoter and fibronectin induce actin stress fibers and focal adhesion sites in spreading human erythroleukemia (HEL) cells. *Eur. J. Cell Biol.* **44**: 238-246.
- *Juliano, R.L. and Haskill, S. (1993). Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **120**: 577-585.
- *Kern, A., Briesewitz, R., Bank, I. and Marcantonio, E.E. (1994). The role of the I domain in ligand binding of the human integrin $\alpha 1 \beta 1$. *J. Biol. Chem.* **269**: 22811-22816.
- *Kirchhofer, D., Gailit, J., Roshlati, E., Grzesiak, J. and Pierschbacher, M.D. (1990). Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa. *J. Biol. Chem.* **265**: 18525-18530.
- *Kirchhofer, D., Grzesiak, J. and Pierschbacher, M.D. (1991). Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **266**: 4471-4477.
- *Koedam, J.A., Cramer, E.M., Briend, E., Furie, B., Furie, B.C. and Wagner, D.D. (1992). P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulatory pathway in AtT-20 cells. *J. Cell Biol.* **116**: 617-625.
- *Kouns, W.C., Wall, C.D., White, M.M., Fox, C.F. and Jennings, L.K. (1990). A conformation-dependent epitope of human platelet glycoprotein IIIa. *J. Biol. Chem.* **265**: 20594-20601.
- *Kovach, N.L., Carlos, T.M., Yee, E. and Harlan J.M. (1992). A monoclonal antibody to $\beta 1$ integrin (CD29) stimulates VLA-dependent adherence of leukocyte to human umbilical vein endothelial cells and matrix components. *J. Cell Biol.* **116**: 499-509.

- *Lin, E.C.K., Ratnikov, B.I., Tsai, P.M., González, E.R., McDonald, S., Pelletier, A.J. and Smith, J.W. (1997). Evidence that the integrin beta3 and beta5 subunits contains a metal ion dependent adhesion site-like motif but lack an I domain. *J. Biol. Chem.* **272**: 14236-14243.
- *Loftus, J.C., O'Toole, T.E., Plow, E.F., Glass, A., Frelinger, A.L and Ginsberg, M.H. (1990). A $\beta 3$ integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science* **249**: 915-918.
- *Lollo, B.A., Chan, K.W.H., Hanson, E.M., Moy, V.T. and Brian, A.A. (1993). Direct evidence for two affinity states for lymphocyte function-associated antigen 1 on activated T cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 21693-21700.
- *Luque, A., Sánchez-Madrid, F. and Cabañas, C. (1994). Functional regulation of the human integrin VLA-1 (CD49a/CD29) by divalent cations and stimulatory $\beta 1$ antibodies. *FEBS Lett.* **346**: 278-284.
- *Masumoto, A. and Hemler, M. (1993). Multiple activation states of VLA-4. Mechanistic differences between adhesion to CS1/fibronectin and to vascular cell adhesion molecule-1. *J. Biol. Chem.* **268**: 228-234.
- *McEver, R.P. (1994). Selectins. *Curr. Opin. Immunol.* **6**: 75-84.
- *Mechanic, S., Raynor, K., Hill, J.E. and Cowin, P. (1991). Desmocollins form a distinct subset of the cadherin family of cell adhesion molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4476-4480.
- *Miyake, K., Yamashita, Y. and Kimoto, M. (1994). A calcium- or manganese-dependent epitope on the integrin beta1 chain recognized by a unique mAb. *Int. Immunol.* **6**: 1221-1226.
- *Miyamoto, S., Teramoto, H., Gutkind, J.S. and Yamada, K.M. (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J. Cell Biol.* **135**: 1633-1642.
- *Mould, A.P., Akiyama, S.K. and Humphries, M.J. (1995). Regulation of integrin $\alpha 5 \beta 1$ -fibronectin interactions by divalent cations. *J. Biol. Chem.* **270**: 26270-26277.
- *Mould, A.P., Garrat, A.N., Askari, J.A., Akiyama, S.K. and Humphries, M.J. (1995). Identification of a novel anti-integrin monoclonal antibody that recognises a ligand-induced binding site epitope on the $\beta 1$ subunit. *FEBS Letters.* **363**: 118-122.
- *Müller, U., Wang, D., Densa, S., Meneses, J.J., Pedersen, P.A. Reichardt, L.F. (1997). Integrin $\alpha 8 \beta 1$ is critically important for

epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell*. **88**: 603-613.

*Nishikuza, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*. **308**: 693-698.

*Phillips, D.R., Charo, I.F. and Scarborough, R.M. (1991). GPIIb-IIIa: The responsive integrin. *Cell* **65**: 359-362.

*Piali, L., Hammel, P., Uherek, C., Bachmann, F., Gisler, R.H., Dunon, D. and Imhof, B.A. (1995). CD31/PECAM-1 is a ligand for alphav beta3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol.* **130**: 451-460.

*Picker, L.J., Treer, J.R., Nguyen, M., Terstappen, L.W.M.M., Hogg, N. and Yednock, T. (1993). Coordinate expression of beta1 and beta2 integrin "activation" epitopes during T cell responses in secondary lymphoid tissue. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2751-2757.

*Pischel, K.D., Hemler, M.E., Huang, C., Bluestein, H.G. and Woods, V.L. (1987). Use of the monoclonal antibody 12F1 to characterize the differentiation antigen VLA-2. *J. Immunol.* **138**: 226-233.

*Plow, E.F. and Ginsberg, M.H. (1989). Cellular adhesion: GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor. *Prog. Hemost. Thromb.* **9**: 117-156.

*Postigo, A.A. and Sánchez-Madrid, F. (1993). Adhesion and homing molecules. *Transplantation proceedings*. **25**: 65-69.

*Prockop, D.J. and Kivirikko, K.I. (1995). Collagens: molecular biology, diseases and potential for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 403-434.

*Pulido, R., Cebrian, M., Acevedo, A., de Landázuri, M.O. and Sánchez-Madrid, F. (1988). Comparative biochemical and tissue distribution study of four distinct CD45 specificities. *J. Immunol.* **140**: 3851-3857.

*Puzon-McLaughlin, W., Yednock, T.A. and Takada, Y. (1996). Regulation of conformation and ligand binding function of integrin alpha5 beta1 cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* **271**: 16580-16585.

*Qian, F., Vaux, D.L. and Weissman, I.L. (1994). Expression of the integrin $\alpha 4 \beta 1$ on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation. *Cell*. **77**: 335-347.

*Rosales, C., O'Brien, V., Kornberg, L. and Juliano, R. (1995). Signal transduction by cell adhesion receptors. *Bioch. Biophys. Acta* **1242**: 77-98.

- *Rosen, G.D., Sanes, J.R., LaChance, R., Cunningham, J.M., Roman, J. and Dean, D.C. (1992). Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell*. **69**: 1107-1119.
- *Roshlahti, E. (1988). Fibronectin and its receptors. *Ann. Rev. Biochem.* **57**: 375-413.
- *Ruppert, M., Aigner, S., Hubbe, M., Yagita, H. and Altevogt, P. (1995). The L1 adhesion molecule is a cellular ligand for VLA-5. **131**: 1881-1891.
- *Sánchez-Mateos, P., Cabañas, C. and Sánchez-Madrid, F. (1996). Regulation of integrin function. *Sem. Cancer Biol.* **7**: 99-109.
- *Sasaki, M., Kleinman, H.K., Huber, H., Deutzmann, R. and Yamada, Y. (1988). Laminin, a multidomain protein. *J. Biol. Chem.* **15**: 16536-16544.
- *Schliwa, M., Nakamura, K.R., Porter and Eutenauer, U. (1984). A tumor promotor induces rapid and coordinated reorganization of actin and vinculin in cultured cells. *J. Cell Biol.* **99**: 1045-1059.
- *Schnapp, L.M., Hatch, N., Ramos, D.M., Klimanskaya, I.V., Sheppard, D. and Pytela, R. (1995). The human integrin alpha8 beta1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin and vitronectin. *J. Biol. Chem.* **270**: 23196-23202.
- *Swartz, M.A., Schaller, M.D. and Ginsberg. (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**: 549-599.
- *Shattil, S.J., Hoxie, J.A., Cunningham, M. and Brass, L.F. (1985). Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.* **260**: 11107-11114.
- *Shaw, L.M. and Mercurio, A.M. (1993). Regulation of alpha6 beta1 integrin laminin receptor function by the cytoplasmic domain of the alpha6 subunit. *J. Cell Biol.* **123**: 1017-1025.
- *Shiba, Y., Sasaki, Y. and Kanno, Y. (1988). 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate disrupts actin filaments and focal contacts and enhances binding of fibronectin coated latex beads to 3T3-L1 cells. *Exp. Cell Res.* **178**: 233-241.
- *Smith, L.L., Cheung, H.K., Ling, L.E., Chen, J., Sheppard, D., Pytela, R. and Giachelli, C.M. (1996). Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J. Biol. Chem.* **271**: 28485-28491.
- *Sonnenberg, A., Modderman, P.W. and Hogervorst, F. (1988). Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature* **336**: 487-489.

- *Springer T.A. (1990). Adhesion receptors or the immune system. *Nature* **346**: 425-434.
- *Springer T.A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**: 301-314.
- *Springer T.A. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 827-872.
- *Stuiver, I. and O'Toole, T.E. (1995). Regulation of integrin function and cellular adhesion. *Stem cells*. **13**: 250-262.
- *Takada, Y. and Puzon, W. (1993). Identification of a regulatory region of integrin $\beta 1$ subunit using activating and inhibiting antibodies. *J. Biol. Chem.* **268**: 17597-17601.
- *Takagi, J., Isobe, T., Takada, Y. and Saito, Y. (1997). Structural interlock between ligand-binding site and stalk-like region of beta 1 integrin revealed by a monoclonal antibody recognizing conformation-dependent epitope. *J. Biochem.* **121**: 914-921.
- *Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* **251**: 1451-1455.
- *Tuckwell, D.S., Weston, S.A. and Humphries, M.J. (1993). Integrins: a review of their structure and mechanism for ligand binding. *Symposia of the society for experimental biology*. **XLVII**: 107-136.
- *van de Wiel-van Kemenade, E., van Kooyk, Y., de Boer, A.J., Huijbens, R.J.F., Weder, P., van de Kastele, W., Melief, C.J.M. and Figdor, C.G. (1992). Adhesion on T and B lymphocytes to extracellular matrix and endothelial cells can be regulated through the β subunit of VLA. *J. Cell Biol.* **117**: 461-470.
- *van Kooyk, Y., Weder, P., Hogervorst, R., Verhoeven, A.J., van Seventer, G., te Velde, A.A., Borst, J., Keizer, G.D. and Figdor, C.G. (1991). Activation of LFA-1 through a Ca^{2+} -dependent epitope stimulate lymphocyte adhesion. *J. Cell Biol.* **112**: 345-354.
- *Varner, J.A., Brooks, P.C. and Cheresch, D.A. (1995). The integrin $\alpha v \beta 3$: Angiogenesis and Apoptosis. *Cell Adhesion and communications*. **3**: 367-374.
- *Wayner, E.A. and Carter, W.G. (1987). Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique alpha and common beta subunits. *J. Cell Biol.* **105**: 1873- 1884.
- *Weisel, J.W., Nagaswani, C., Vilaire, G. and Bennet, J.S. (1992). Examination of the membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **267**: 16637-16643.

- *Weitzman, J.B., Pasqualini, R., Takada, Y. and Hemler, M. (1993). The function and distinctive regulation of the integrin VLA-3 in cell adhesion, spreading, and homotypic cell aggregation. *J. Biol. Chem.* **268**: 8651-8657.
- *Werb, Z., Tremble, P.M., Behrendtsen, O., Crowley, E. and Damsky, C.H. (1989). Signal transduction through the fibronectin receptor induce collagenase and stromelysin gene expression. *J. Cell Biol.* **109**: 877-889.
- *Wong, D.A., Davis, E.M., LeBeau, M. and Springer, T.A. (1993). Cloning and chromosomal localization of a novel gene-encoding a human beta2-integrin alpha subunit. *Gene.* **171**: 291-294.
- *Yednock, T.A., Cannon, C., Vandever, C., Goldbach, E.G., Shaw, G., Ellis, D.K., Liaw, C., Fritz, L.C. and Tanner, L.I. (1995). $\alpha 4 \beta 1$ integrin-dependent cell adhesion is regulated by a low affinity receptor pool that is conformationally responsive to ligand. *J. Biol. Chem.* **270**: 28740-28750.
- *Yurochko, A.D., Liu, D.Y., Eierman, D. and Haskill, S. (1992). Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 9034-9038.
- *Zhang, Z., Vuori, K., Wang, H.G., Reed, J.C. and Ruoslahti, E. (1996). Integrin activation by R-ras. *Cell* **85**: 61-69.
- *Zimmerman, G.A., Prescott, S.M. and McIntyre, T.M. (1992). Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol. Today.* **13**: 93-100.

8. ANEXO

8. Publicaciones científicas que han dado lugar durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral y otras colaboraciones:

8.1. Luque, A., Sánchez-Madrid, F., and Cabañas, C. (1994). Divalent cation regulation of the activation of the integrin VLA-1 (CD49a/CD29). FEBS Letters. **346**, 278-284.

8.2. Luque, A., Gómez, M. Puzon, W., Takada, Y., Sánchez-Madrid, F. and Cabañas, C. (1996). Activated conformations of Very Late Antigen Integrins detected by a group of Antibodies (HUTS) specific for a novel regulatory region (355-425) of the common $\beta 1$ chain. J. Biol. Chem. **271**, 11067-11075.

8.3. Gómez, M., Luque, A., del Pozo, M. A., Hogg, N., Sánchez-Madrid, F. and Cabañas, C. (1997). Functional relevance during lymphocyte migration and cellular localization of a Ligand Induced Binding Site on $\beta 1$ Integrin. European Journal of Immunology. **27**: 8-16.

8.4. Muñoz, M., Serrador, J., Nieto, M., Luque, A., Sánchez-Madrid, F. and Teixidó, J. A novel region of the $\alpha 4$ integrin subunit with a modulatory role in VLA-4-mediated cell adhesion to fibronectin. Biochemical Journal (en prensa).

8.5. Luque, A., Cabañas, C., Raab, U., Letamendia, A., Páez, E., Herreros, L., Sánchez-Madrid, F., Bernabeu, C. The use of recombinant vaccinia virus to generate mAb against the cell surface protein endoglin. FEBS Letters (en prensa).